

VERSUCHE ZUR IMMUNISIERUNG
VON MÄUSEN
GEGEN BABESIA RODHAINI,
B. MUSCULI, B. MICROTI UND
B. GALAGOLATA

RICHARD EGER

1976

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch

Versuche zur Immunisierung von Mäusen gegen
Babesia rodhaini, *B. musculi*,
B. microti und *B. galagolata*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Richard Eger
aus
Schwabmünchen

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. P. A. Bachmann

Tag der Promotion: 30. Juli 1976



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Bisher durchgeführte Untersuchungen über Babesienantigene und deren immunogene Wirkung (an Hand der Literatur)	
1. Isolierung von Antigenen	2
2. Antigene Eigenschaften	3
3. Antigene Verwandtschaft	6
4. Immunisierungsversuche	12
III. Eigene Untersuchungen	
A. Material und Methode	
1. Antigengewinnung	16
2. Immunisierung	19
3. Serologische Methode für den Antikörpernachweis	20
4. Belastungsinfektion	20
B. Ergebnisse	
1. Verlauf der Parasitämie nicht immunisierter Mäuse	
a. negative Kontrolle	23
b. Injektion von Vollblut (Kontrolle)	23
c. Injektion von komplettem Freund'schem Adjuvans (Kontrolle)	23
d. Kontrollgruppe nicht immunisierter und nicht belasteter Tiere	25
2. Immunogene Wirkung sämtlicher Teilantigene gegen die vier Babesienarten	
a. Babesia rodhaini	
somatische Antigene	25
metabolische Antigene ..	27

b. <i>Babesia musculi</i>	
somatische Antigene	29
metabolische Antigene ..	30
c. <i>Babesia microti</i>	
somatische Antigene	33
metabolische Antigene ..	35
d. <i>Babesia galagolata</i>	
somatische Antigene	37
metabolische Antigene ..	38
IV. Besprechung der Ergebnisse	42
V. Zusammenfassung und Summary	51
VI. Literaturverzeichnis	53

Lebenslauf

I. Einleitung

Die Babesiose der Rinder ist insbesondere in tropischen Zonen von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Trotz wirksamer Chemotherapeutika treten immer noch hohe Verluste auf. Somit kommt der frühen und sicheren Diagnose durch den mikroskopischen Nachweis sowie mittels spezifischer und empfindlicher serologischer Methoden besondere Bedeutung zu.

Überstandene Babesien-Infektionen hinterlassen in der Regel eine artspezifische Prämunität, die die Tiere vor erneuter klinischer Erkrankung schützt. Sie stellen deshalb ein stetes Erregerreservoir dar. Die Erzeugung einer sterilen Immunität hingegen würde im Hinblick auf die Epizootologie von entscheidendem Vorteil sein.

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene somatische und metabolische Antigene von vier Babesienarten, nämlich *Babesia rodhaini*, *Babesia musculi*, *Babesia microti* und *Babesia galagolata* auf ihre immunisierende Wirkung am Modell der Maus untersucht werden.

II. Bisher durchgeführte Untersuchungen über Babesien- antigene und deren immunogene Wirkung (an Hand der Literatur)

1. Isolierung von Antigenen

Für die Serodiagnostik ebenso wie für Immunisierungsversuche ist die Verwendung geeigneter reiner Antigene von entscheidender Bedeutung.

SOULSBY (1972) sowie MAHONEY und GOODGER (1972) berichteten über Möglichkeiten der Herstellung reiner Babesienantigene. Sie ist wegen der intraerythrozytären Entwicklung des Parasiten schwierig und zudem durch das Fehlen eines geeigneten Kulturmediums kompliziert.

RISTIC und M. (1971) sowie SOULSBY (1972), der noch ausführlicher auf die Herstellung und Analyse somatischer wie metabolischer Babesienantigene einging, zeigten die verschiedenen Möglichkeiten der Antigengewinnung auf.

Die Antigenisolierung erfolgte bei maximaler Parasitämie. Zur Freisetzung der Babesien aus den Erythrozyten hatten die Autoren neben Saponin, Druck, Enzymen, Ultraschall, Gefrieren und Auftauen auch die Anwendung hyper- wie hypotoner Lösungen empfohlen. Bei letzterem wurde Aqua destillata verwendet. Durch Ultrazentrifugieren gelang dann eine Konzentrierung der somatischen Antigene. Die serumlöslichen, metabolischen Babesienantigene fraktionierte SOULSBY (1972) mit Hilfe von DEAE-Cellulose oder Sephadex verschiedener Korngröße. Die dabei anfallenden Teilantigene fällte er anschließend durch Behandlung mit Protaminsulfat (PS). So entstand eine PS-Antigenverbindung, die hauptsächlich aus Mukoproteinen bestand, mit der er Immunisierungsversuche vornahm. Nach Abkochen konnte SOULSBY (1972) ein hitzebeständiges, lösliches Polysaccharid abtrennen, das serologisch aktiv und im Normalserum nicht nachweisbar war. Für einige Tiere schienen diese metabolischen Teilantigene toxisch zu sein. SIBINOVIC und M. (1967 b) berichteten, daß

durch Applizieren von Teilantigenen Schock entstand und brachten diese Erscheinung in Beziehung mit dem beachtlichen Anstieg von Hämoglobin im Blut und dessen Koagulation. Bestätigt wurde diese Beobachtung von WRIGHT (1975), der bei akuter Parasitämie durch *B. argentina* vasodilatatorischen Schock feststellte und diese Wirkung auf eine Parasitenesterase zurückführte. Prekallikrein wurde dadurch stimuliert. Es kam zu einer intravasalen Koagulation, die besonders für Lunge und Niere gefährlich war. Durch reflektorisch ausgelöste Vasodilatation entstand ein Schock, der Anoxie zur Folge hatte und tödlich war.

2. Antigene Eigenschaften

Antigene Eigenschaften verschiedener Babesienstämme im Hinblick auf die serologische Verwandtschaft und immunisierende Wirkung untersuchten RISTIC und M. (1971) bei den beiden Hundebabesienarten *B. canis* und *B. gibsoni*. Nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen der Erythrozyten und anschließender Homogenisierung wurde das Hämoglobin durch Waschen mit PBS entfernt und anschließend abzentrifugiert. Die so erhaltenen Teilantigene zeigten in der Immunodiffusion, daß *B. gibsoni* neben speziesspezifischen Antigenen auch ein gemeinsames gattungsspezifisches Antigen mit *B. canis* besaß. Durch weitere Versuche wurde ebenso antigene Verwandtschaft zwischen Nager-, Rinder- und Pferdebabesien vermutet. Daneben untersuchten RISTIC und M. (1971) bei Pferden, die mit *B. caballi* infiziert wurden, das Vorkommen der löslichen Antigene im akuten Krankheitsstadium. Zum Nachweis diente ihnen antikörperhaltiges Serum latent infizierter Pferde. Durch indirekte Hämagglutination (IHA) erhielten sie ab dem 10. Tag eine positive Reaktion, die bis zum 30. Tag anhielt. Spezifische Antikörper stellten sie erstmals 3 Monate post infectionem (p.i.) mit Hilfe der Agargelpräzipitation fest und wiesen sie 7 Monate lang nach.

Mit gleicher Versuchsanordnung zeigte sich mit der indirekten Hämagglutination bei mit *B. canis* infizierten Hunden bereits ab dem 6. Tag p.i. eine positive Reaktion. Neben anderen Autoren gelang TÜLLMANN (1976) bei mit *B. rodhaini* infizierten Mäusen schon ab dem 5. Tag p.i. der Nachweis von Antikörpern im Serum mit Hilfe der Immunodiffusion.

Dank verfeinerter Techniken zeigten COX und TURNER (1970) an mit *B. microti* immunisierten und später mit demselben Babesienstamm belasteten Mäusen mit dem indirekten Fluoreszenztest (IFAT), daß der Anstieg von Antikörpern beim Challengeversuch exakt mit dem Parasitämianstieg erfolgte. Durch Auftrennung des verwendeten Anti-Maus-Immunglobins in JgG und JgM präzisierten sie ihre Aussage dahingehend, daß JgM nur bis zum kritischen, dem 10. - 12. Tag anstieg und dann annähernd auf gleicher Höhe blieb, während JgG bis zum 22. Tag weiter vermehrt gebildet wurde und sich später der Gesamtimmunglobinkurve annäherte, die bis zum 52. Tag p.i. verfolgt wurde. Die Autoren schlossen daraus auf mehr unspezifische, aber sofortige Reaktion des Makroimmunglobulins (JgM) gegenüber dem spezifischen, jedoch erst später gebildeten Immunglobulin G.

In einer Untersuchung, die zur Klärung der Strukturanalyse unbekannter Antigene dienen sollte, wurden von SIBINOVIC und M. (1967 a) metabolische, serumlösliche Antigene aus akut infizierten Pferden, Hunden und Ratten gewonnen. Durch säulenchromatographische Auftrennung wurden Hämoglobin, Lipide, Lipoproteide sowie größere Anteile alpha-, beta- und gamma-Globulinfraktion abgetrennt. Mit Gradientenzentrifugation erfolgte anschließend die Trennung des Serumantigens in die Fraktionen A und B. Beide reagierten mit der gleichen Intensität mit sämtlichen Antigenen, jedoch stellten die Fraktionen

A und B unterschiedliche Antigene dar. Fraktion A wanderte mit der Geschwindigkeit eines gamma-Globulins und hatte die Sedimentationskonstante 8 S (1 S = 1 SVEDBERG = 1 Sedimentationseinheit), die in der analytischen Ultrazentrifugation ermittelt wurde. Fraktion B verhielt sich elektrophoretisch wie ein beta-Globulin und hatte je nach Tierart die Sedimentationskonstante von 20 - 29 S. Beide Fraktionen stellten Verbindungen von Lipiden, Peptiden, Phosphaten und Polysacchariden dar.

D'ALESSANDRO (1972) untersuchte die von infizierten Ratten gebildeten Antikörper nur mit serumlöslichen Exoantigenen, konnte aber keinen klaren Bezug erkennen. So glaubte er, unterstützt von RISTIC und M. (1971), daß die dabei erzeugte Hämolyse an einer immunogenen Wirkung beteiligt sein könnte. Auch MCHARDY (1967) schrieb hämolytischem Serum bei seinem Versuch mit B. rodhaini infizierten Mäusen größeren Schutzeffekt zu. Er vermutete eine durch Autoimmunantigene erzeugte Anämie, die Erythropoesestimulation bewirkte und somit eine schützende Wirkung hervorrief.

Wie schwierig Isolierung und Analyse von Serumantigenen sind, zeigten auch MAHONEY und GOODGER (1972). Ihnen gelang es an mit B. argentina immunisierten Kälbern, die oben angedeuteten Vermutungen zu erhärten. Sie konnten wirtseigene Serumkomponenten mit Hilfe spezifischer Antiseren nachweisen. Dabei erwies sich eine Substanz mit dem Rinderfibrinogen identisch, eine andere stellte ein makromolekulares, Lysin stimulierendes Autoantigen dar, das auch in einem Kalb mit chemisch induzierter Anämie nachgewiesen wurde. Bei weiterer Analyse konnten noch zwei Autoantigene isoliert werden, ein polymeres Haptoglobin und ein Rinderblutgruppenantigen. Sie erzeugten präzipitierende Antikörper, die aber für eine Babesieninfektion unspezifisch waren. Ein weiteres Anti-

gen dagegen rief die Bildung spezifischer *B. argentina*-Antikörper hervor, bestehend aus mehreren Serumproteinen mit reaktiven Gruppen, das sogar entmilzte Kälber gegen eine Belastungsinfektion mit *B. argentina* schützte. Im Gegensatz zu RISTIC und M. (1971), die durch Immunisierung mit isolierten Serumantigenen einen Schutz gegen homologe und heterologe Babesienarten nachgewiesen hatten, waren die von *B. argentina* induzierten Serumantigene artspezifisch. Durch Belastungsinfektion mit einer heterologen Art zeigten die Kälber nur eine verlängerte Präpatenz bis zu drei Tagen, während sich gegenüber der homologen Babesienart ein vollkommener Schutz entwickelte, der sich durch plötzliches Verschwinden der Parasiten aus dem peripheren Blut auszeichnete.

Versuche von CLARK und M. (1975) an mit *B. microti* infizierten Mäusen bekräftigten die genannten enzymatischen Erscheinungen von MAHONEY und GOODGER (1972). CLARK und M. (1975) konnten in nach Giemsa gefärbten Blutaussstrichen bei 2 800-facher Vergrößerung intraerythrozytäre Einschlusskörperchen feststellen. An Hand weiterer Untersuchungen vermuteten sie Restbestandteile von toten Babesien, die beim Parasitämieabfall vermehrt auftraten. Diese Erscheinung führten die Autoren auf einen löslichen Metaboliten zurück, der von der Wirtszelle während des intraerythrozytären Eindringens des Parasiten gebildet wurde und dann zu Babesienpyknose führte, was elektronenmikroskopisch belegt werden konnte.

3. Antigene Verwandtschaft

COX und YOUNG (1969) untersuchten die erworbene Immunität bei Mäusen, die mit *B. microti* und *B. rodhaini* infiziert und durch Diamprontherapie am Überleben gehalten worden waren. Bei erneuter Belastung der primär mit *B. rodhaini* infizierten Mäuse durch *B. rodhaini* trat Immunität gegen die homologe Babesienart auf, während bei einem Challengeversuch mit *B. microti* eine höhere Para-

sitämie beobachtet wurde. Zum gleichen Ergebnis kamen sie auch bei den mit *B. microti* immunisierten Mäusen. Daraus schlossen COX und YOUNG (1969) auf eine antigene Ähnlichkeit der beiden Babesienarten.

PHILLIPS (1969 b) kam jedoch bei seinem Versuch mit *B. rodhaini* infizierten Ratten zum gegenteiligen Ergebnis. Eine große Anzahl drei Wochen alter Ratten von immunisierten und nicht immunisierten Muttertieren wurde entmilzt. Drei Wochen nach der Operation erfolgte die Belastung. Alle splenektomierten Ratten starben 1 - 2 Tage früher als die intakte Kontrollgruppe. Der Parasitämieanstieg der Tiere von immunisierten Müttern erfolgte erst eine Woche später. Damit wies PHILLIPS (1969) im Gegensatz zu COX und YOUNG (1969) auf die Bedeutung der Milz sowohl für das Erwerben (Antikörperproduktion) wie auch für die Erhaltung (Phagozytose und Hämoopoese) einer Immunität hin. Auch SCHINDLER und M. (1970) kamen bei Untersuchungen mit Hunden nach einer Infektion mit *B. canis* zum gleichen Ergebnis. Sie vermuten, daß für die Abwehr in erster Linie Immunozyten verantwortlich sind, während humorale Antikörper keine parasitizide Wirkung besitzen. PHILLIPS (1969 a) wertete Serum immunisierter Ratten gegen eine *B. rodhaini*-Infektion aus. Er konnte durch täglich kleine Serummengen in der Phase des Parasitenanstiegs lediglich die klinischen Symptome der Babesiose mildern, nicht den Parasitämieverlauf ändern. Damit wurde der Vorschlag von LEVINE (1973) bekräftigt, die besonders gefährdeten Rinder in den tropischen Zonen durch Lebendinfektionen mit Babesien prophylaktisch zu schützen. Er erreichte dadurch jedoch häufiger Prämunität als sterile Immunität.

Wegen der wenig befriedigenden Ergebnisse der Vakzinierung mit lebenden Babesien und der Gefahr latenter Infektionen führte SIBINOVIC (1966) Immunisierungsversuche nur mit Serumantigenen durch. Er erzielte mit

homologen Serumgesamtantigenen von *B. canis* einen Immunschutz bei Hunden für 9 Monate. Ferner konnte er zeigen, daß die an beta-Globulin gebundene Fraktion von *B. canis* sowohl Hunde wie Ratten gleich gut gegen eine Belastungsinfektion mit diesen Parasiten schützt. Auch mit homologem Immunserum bewirkte er einen Schutz für 45 Tage. Später verwendeten SIBINOVIC und M. (1967 a) metabolische Gesamtantigene von *B. canis* infizierten Hunden, *B. rodhaini* infizierten Ratten und einem Gemisch mit *B. equi* und *B. caballi* infizierten Pferden. Bei der Immunisierung sämtlicher Tierarten mit heterologen Serumgesamtantigenen und Belastung durch *B. rodhaini* stellten sie nur einen geringen Schutz fest. Dagegen trat nach Fraktionierung und Immunisierung mit heterologen, an Globulin gebundenen Antigenen Immunität auf. Nach weiterer Auftrennung in Antigen A (an gamma-Globulin gebundenes Antigen) und Antigen B (an beta-Globulin gebundenes Antigen) wurde durch letzteres stärkere Immunität gebildet. Antigen A dagegen erzeugte primär starke Anämie und erst sekundär gleiche Immunität wie Antigen B. SIBINOVIC und M. (1967 a) glauben, daß die im akuten Stadium der Erkrankung entstandenen Serumantigene, speziell die an beta-Globulin gebundene Fraktion, schützende Antikörper erzeugt hatten. Sie wurden im Serum zu löslichen Immunkomplexen verbunden und führten durch Kontrolle der Erregervermehrung zu einer Infektionssterilität.

COX, MILAR und PATTERSON (1968 a) versuchten unter anderem durch Kreuzreaktionen mit Serumantigenen, gewonnen von *B. rodhaini* infizierten Ratten und latent mit *B. rodhaini* infizierten Tieren, die antigenen Eigenschaften mit Hilfe der Gelpräzipitation zu differenzieren. Sie bestätigten das Ergebnis von SIBINOVIC und M. (1967 a), daß metabolische Antigene bei hoher Parasi-

tämie an Globuline gebunden worden waren und Kreuzreaktionen wegen ihrer ähnlichen Struktur verursachten. Später bezogen COX, MILAR und PATTERSON (1968 b) Plasmodien mit ein. Mäuse, infiziert mit *P. chabaudi*, waren gegenüber einer Belastungsinfektion von *B. rodhaini* resistent. Die Tiere, die schon eine Woche nach überstandener Plasmodieninfektion belastet wurden, schienen resistenter als jene Mäuse, die erst nach fünf Wochen belastet wurden. Andererseits verhielten sie sich bei Belastung mit *P. berghei* wie die Kontrollen. Nach drei Tagen zeigte sich aber auch hier ein Rückgang der Parasitämie. Daraus schlossen die Autoren, daß Plasmodien wie Babesien unspezifische und spezifische Immunität entwickelten. Auch LUDFORD und M. (1972) beobachteten Kreuzreaktionen zwischen Babesien und Plasmodien. Mit der indirekten Fluoreszenzmikroskopie konnten sie sogar bei malariainfizierten Menschen Antikörper gegen Babesien nachweisen.

Die oben angeführten Kreuzreaktionen führte ZWISLER (1976) auf immunologische Reaktionen durch Parasitenbefall zurück, die verschiedene Antigene der unterschiedlichen Entwicklungsformen induzierten. Für weitere Veränderungen des antigenen Verhaltens machte er neben dem Immundruck auch einen Einbau von Wirtsbestandteilen oder Absorption von blockierenden Antikörpern, besonders der verschiedenen Immun-Globulinklassen, verantwortlich. Somit entsteht eine komplexe Immunantwort, die die Kreuzreaktionen verständlich macht. Den größten Einfluß hat jedoch die lange Verweildauer des Erregers im infizierten Vertebraten, wie PHILLIPS (1969 a) in seinem Versuch mit *B. rodhaini* infizierten Ratten bewies. Bis zu 12 Monate nach der ersten Parasitämie konnten Babesien nachgewiesen werden. Durch gleiche Ergebnisse bei Versuchen mit Trypanosomen- und Malariainfektionen wies PHILLIPS (1969 a) auf die Fähigkeit der Antigenvariationen hin, die dem Parasiten das

Überleben ermöglichte und zu einem chronischen Krankheitsverlauf führte. 1971 demonstrierte PHILLIPS (1971 a) den Nachweis der Antigenvariationen mit bestrahlten *B. rodhaini*-Parasiten. Ratten wurden infiziert und nach 14 - 20 Tagen mit derselben Art belastet. Es zeigte sich eine Immunität, die aber bei erneuter Injektion von nicht bestrahlten *B. rodhaini*-Formen nur teilweise bestehen blieb. Hiermit wird deutlich, daß jede der verwendeten Gruppen etwas andere antigene Eigenschaften besaß.

Die antigene Variation der Immuneinwirkung auf *B. rodhaini* untersuchten auch ROBERTS und TRACEY-PATTE (1975 a). Sie infizierten Mäuse mit Babesien und hielten sie durch Immuserum am Überleben. Je nach Konzentration und Spezifität der Antikörper änderten ganze Parasitenkolonien geringfügig ihre Antigenität. Bei weiterer Tierpassage erfolgte keine weitere antigene Variation über mindestens 30 Generationen. Daraus wurde deutlich, daß die ständige Antigenabänderung durch verstärkte Immunität induziert wurde. In einer anschließenden Untersuchung, die dem Stadium von Wechselwirkungen von Immuserum auf *B. rodhaini* diente, stellten ROBERTS und TRACEY-PATTE (1975 b) einen sigmoiden Parasitämieverlauf fest. Sie schlossen daraus auf eine Resistenzbildung nach 24 Stunden. Damit wurde der Mangel der Spezesspezifität bei metabolischen Gesamtantigenen erneut deutlich.

Die Wirkung der Serumantigene auf parasitierte wie intakte Erythrozyten untersuchten SIBINOVIC und M. (1969). Mit Hilfe der Immunofluoreszenz konnten sie zeigen, daß die an beta-Globulin gebundene Fraktion in Ratten bereits wenige Minuten nach der Infektion an die parasitierten Erythrozyten gebunden worden war und diese antigensensibilisierten roten Blutkörperchen sehr schnell aus dem peripheren Blutkreislauf entfernt wurden. Hier-

mit konnten die Autoren belegen, daß die entstehende Anämie zumindest teilweise durch beta-Globuline verursacht wurde. Bei diesen Untersuchungen gelang auch der Nachweis von löslichem Antigen im Zytoplasma infizierter Erythrozyten. Bei frei im Serum angetroffenen Babesienformen konnten SIBINOVIC und M. (1969) überhaupt keine Fluoreszenz beobachten. Die Antigene waren deshalb nach Meinung der Autoren Stoffwechselprodukte junger Parasitenstadien, die während der Entwicklung der Parasiten in das Zytoplasma diffundierten und sich an der Oberfläche der Erythrozyten anreicherten. WRIGHT (1975) stellte elektronenmikroskopisch keine Verbindung zwischen Erythrozytenmembran und Antigen fest. Zur gleichen typischen Fluoreszenzfärbung mit dem IFAT kamen auch MAHONEY und GOODGER (1972) bei Versuchen mit *B. argentina* infizierten Rindererythrozyten. Durch Ultraschall isolierte Parasiten, wie auch infizierte Erythrozyten, agglutinieren mit dem Immunglobulin, das spezifisch mit dem Serumantigen reagierte. Infektionsversuche mit diesen roten Blutkörperchen verliefen negativ. Dagegen mußten babesienhaltige Erythrozyten in natürlicher Verdauung bis zu einer Stunde mit spezifischem Immunglobulin inkubiert werden, bis sie ihre Infektiosität verloren, wobei auch der Infektionsverlust durch unspezifische Denaturierung der Erythrozyten in dieser Zeit verursacht werden konnte. Die Autoren vermuten, daß die Aktivität der spezifischen Antikörper mehr gegen die veränderten Erythrozyten als gegen die Parasiten selbst gerichtet war. Das würde bedeuten, daß der Ursprung der Serumantigene verstärkt in den Erythrozyten zu suchen ist. Inwieweit diese antigenen Substanzen auf den Parasiten selbst zurückgehen, oder ob nur Veränderungen der infizierten Wirtszelle in ihrer Entstehung beteiligt sind, konnte bisher nicht geklärt werden.

4. Immunisierungsversuche

Zur Abklärung der stärksten antigenen Wirkung, wie deren Ursprung, führte PHILLIPS (1967) neben Immunisierungsversuchen mit Immunseren, Lebendimpfstoffen und metabolischen Antigenen auch Versuche mit somatischen B. rodhaini-Antigenen bei Ratten durch. Die Parasiten wurden mit beta-Propiolakton oder Formalin abgetötet, ohne sie zuvor aus den Erythrozyten zu isolieren. Das gewaschene und abzentrifugierte somatische Gesamtantigen injizierte er mit Freund'schem Adjuvans. Durch Kontrollversuche ohne die substituierende Wirkung des Adjuvans wurden schlechtere Ergebnisse erzielt. Der Autor erhielt durch fortlaufende kleinere intramuskuläre Applikationen bei Ratten eine bessere immunisierende Wirkung als durch subkutane Injektionen. Der erzielte Immunschutz hielt mindestens drei Monate an, er schien jedoch der Schutzwirkung von 9 Monaten, die SIBINOVIC (1966) mit metabolischem Serumantigen erhielt, unterlegen zu sein. SOLTYS (1973) verfuhr bei Immunisierungsversuchen mit abgetöteten Parasiten wie MAHONEY (1967); er injizierte gefriergetrocknete Babesien mit Freund'schem Adjuvans oder tötete sie wie PHILLIPS (1967) mit Formalin ab und mischte die somatischen Restbestandteile mit gleichen Volumina Adjuvantien. Dabei erzielte er nur eine Teilimmunität gegen homologe Babesien; seine Immunisierungserfolge mit an gamma- und beta-Globulin gebundenen metabolischen Antigenen waren nicht zu wiederholen.

MAHONEY (1967) immunisierte zwei Jahre alte Rinder mit unlöslichem B. argentina-Antigen, das er mit Freund'schem Adjuvans subkutan applizierte. Im Serum der Tiere konnten daraufhin komplementbindende Antikörper festgestellt werden. Bei Belastungsinfektionen mit der homologen Babesienart zeigten sich keine oder nur geringe

klinische Symptome mit einer Parasitämie bis zu 30 %; die Kontrollgruppe erkrankte teilweise sogar tödlich. Wurden die abgetöteten Babesien intraperitoneal mit aqua dest. Kälbern injiziert, bildete sich nach einer Challengeinfektion und späteren Splenektomie sogar bei ihnen ein geringer Schutz aus. Bei intravenöser Applikation der Antigene starben die Tiere jedoch bei Belastung. MAHONEY (1967) sprach deshalb den somatischen Antigenen eine immunisierende Wirkung zu. Wie die Versuchsanordnung zeigte, schien die starke Immunogenität von der Milz auszugehen. Der fehlende Schutz durch intravenöse Injektion somatischer Antigene führte auf die zu geringe Antikörperbildung der Milz zurück.

McHARDY (1967) immunisierte 4 Wochen alte Ratten durch zwei subkutane Injektionen im Abstand von 28 Tagen mit einem Homogenisat aus Leber, Milz und Niere von Mäusen, die mit *B. rodhaini* injiziert waren. Jede Dosis mit dem Homogenisat enthielt etwa 5 mg Mäuseprotein. 14 Tage später wurden die Ratten mit 1×10^8 parasitierten Erythrozyten belastet. Es zeigte sich, daß die spezifische Immunität von somatischen Babesienantigenen ausging. Der Autor schloß nicht aus, daß die Immunität auch durch Wirtsmaterial, das an den Parasiten gebunden war, verursacht würde.

Sehr ausführlich beschäftigten sich SCHINDLER, WOKATSCH und SCHRÖDER (1966) mit der Immunitätsbildung gegen *B. canis*, insbesondere nach Immunisierung von Hunden mit löslichem Antigen. Die Vakzinierung erfolgte nach einer von SCHINDLER und DENNIG (1962) beschriebenen Methode mit 1 ml löslichem Antigen, emulgiert in 1 ml komplettem Freund'schem Adjuvans. Zwei und drei Wochen später wurde mit der gleichen Antigenmenge geboostert und anschließend zwei Wochen lang jeden 2. Tag 1 ml lösliches Antigen intravenös injiziert. Die anschließende Belastung überlebten 41 % der Hunde. Gegenüber den Kontrollen, bei denen sich 33 % der Tiere von der Infektion er-

holten, zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Den relativ hohen Prozentsatz der überlebenden Kontrolltiere erklärten sie sich durch häufiges Vorkommen natürlicher Resistenz. Bei Immunitätsversuchen mit lebenden Babesien konnten sie teilweise eine sterile Immunität erzeugen. Die Splenektomie bewirkte erstaunlicherweise keinen Anstieg der Antikörperproduktion. Mit HULLINGER und SORKIN (1963) glauben die Autoren, daß Leukozyten des strömenden Blutes eine erstaunliche Menge von Antikörpern produzieren.

Die Resistenz erläuterte SOULSBY (1972). Er bemerkte bei Untersuchungen mit *B. argentina*, daß bei Rindern bis zu zwei Jahren eine Zunahme der Empfindlichkeit bestand, die dann bis zum sechsten Lebensjahr hin kontinuierlich abnahm. Diese Resistenz führt er auf natürlichen Parasitenbefall und auf unspezifische Antikörper stimulierende Faktoren zurück. Am besten ausgebildet war die Resistenz von der Geburt an bis etwa zum 7. Monat post partum durch maternale Immunglobuline. Vor allem MAHONEY (1967) und PHILLIPS (1967) versuchten deshalb, die Periode erhöhter Empfindlichkeit durch Stimulierung der Immunglobulinproduktion zu überbrücken. Sie verwendeten einen virulenteren und einen weniger virulenten Stamm. Die Autoren gewannen das plasmalösliche Antigen durch Abzentrifugieren und konzentrierten es durch Gefrier Trocknung. Als zweites Antigen verwendeten sie parasitierte Erythrozyten, die sie durch Einfrieren und Auftauen abtöteten. Die anfallende Parasitenstromasuspension wurde ebenfalls gefriergetrocknet. Mit diesen beiden Antigengruppen, gemischt mit Freund'schem Adjuvans, immunisierten sie subkutan 4 Kälbergruppen zu je 8 Tieren. Nach Splenektomie und Belastungsinfektion mit dem L- und G-Stamm von *B. argentina* bildete der weniger virulente Stamm einen Schutz gegen den isologen Babesienstamm. Die Kontrollgruppe starb nach 10 Tagen.

Die restlichen mit Plasmaantigen immunisierten 16 Tiere zeigten die gleiche Wirkung bei Belastung mit dem entsprechend stark virulenten Stamm. Das somatische Antigen erbrachte einen stärkeren, aber wenig spezifischen Schutz gegen den homologen Babesienstamm. Speziesspezifischer war die immunisierende Wirkung von Plasmaantigen; die Parasitämie war zu Beginn geringer, später jedoch starben die Tiere. PHILLIPS (1967) und MAHONEY (1967) vermuten Antigenvariationen, bedingt durch den Entwicklungszyklus des Parasiten. Die angestrebte Immunisierung wurde zudem wegen einer teilweisen immunologischen Toleranz erschwert, die durch die lang andauernde Parasit-Wirt-Auseinandersetzung entstand. Es konnte aber bei starker Wirtsreaktion auch schneller eine Umwandlung der Antigenstruktur mit anschließend höherer Parasitämie erfolgen.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methode

1. Antigengewinnung

Als Versuchstiere verwendete ich etwa sechs Wochen alte, 30 - 35 g schwere NMRJ-Han. Mäuse aus institutseigener Zucht. Die Tiere wurden während des Versuches in Makrolonkäfigen unter gleichbleibenden Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 - 50 % gehalten. Als Futter erhielten sie Altomin-R 1320 Haltungsdiät und Wasser ad libitum. Zur Antigengewinnung wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, da diese wegen gegenseitiger Unverträglichkeit nur für kurze Zeit in Gruppen gehalten werden konnten. Für die Immunisierung verwendete ich weibliche Tiere, da mit diesen die Gruppenhaltung auch über einen längeren Zeitraum problemlos ist.

Die für die Immunisierungsversuche ausgewählten Babesienarten waren *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata*; letztere war aus einem ostafrikanischen Galago isoliert worden (DENNIG, 1973). Diese Babesienarten sind leicht auf Mäuse übertragbar; *B. rodhaini* und *B. musculi* gewährleisteten durch schnelle Vermehrung in diesen Tieren und durch Ausbildung hoher Parasitämien eine sehr gute Antigenausbeute. Mit *B. rodhaini* infizierte Mäuse entwickelten in 6 Tagen eine Parasitämie von 850 - 900 ‰ und starben am 7. Tag. *B. musculi* bildete innerhalb von 10 - 15 Tagen Parasitämien von 700 - 800 ‰; diese Tiere überlebten aber in der Regel die Infektion. Bei den wenig virulenten Arten *B. microti* und *B. galagolata* konnte gleiches Verhalten erst nach Entmilzen erzielt werden. Mäuse, die 14 Tage vor der *B. microti*-Infektion splenektomiert wurden, erreichten dann ebenfalls nach 10 - 12 Tagen Parasitämien von 700 - 800 ‰, während *B. galagolata* nach Entmilzung der Tiere nur eine Parasitämehöhe von 600 - 700 ‰ in 6 - 8 Tagen entwickelte.

Für die Antigengewinnung infizierte ich 200 Mäuse pro Babesienart. Die Inokulation erfolgte intraperitoneal mit 0,2 ml parasitenhaltigen Blutes. Das verwendete Infektionsmaterial stammte von hochparasitämischen Laboratoriumsmäusen, wobei der Parasitämiegehalt durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung auf 4×10^6 Babesien pro Maus eingestellt wurde.

Zur Kontrolle des Infektionsverlaufes entnahm ich täglich Blut aus der Schwanzvene und färbte die Blutaussstriche nach Giemsa oder mit der Diff-Quik-Färbemethode (Fa. Harleco, Abteilung der Merz und Dade GmbH-München) an. Anschließend zählte ich bei 1000-facher Vergrößerung 200 Erythrozyten aus und ermittelte den Promillsatz der befallenen roten Blutkörperchen.

Auf dem Höhepunkt der Parasitämie wurden die Tiere geblutet. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurde Natriumzitrat im Verhältnis 1 : 20 des Blutvolumens zugesetzt. Auf diese Weise konnte pro Maus 1 - 1,5 ml Blut gewonnen werden.

Durch die Blutentnahme auf dem Höhepunkt der Parasitämie wurde ein Höchstmaß an Antigenen für die anschließende Herstellung von löslichen und unlöslichen Bestandteilen im Mäuseblut gesichert. Die grobe Auftrennung der somatischen und serumlöslichen Antigene erfolgte durch zwanzigminütiges Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen pro Minute (Upm). Hierbei trennte sich das Serum ab, das bei -20 °C eingefroren wurde. Es wurde später zur Isolierung des Exoantigens (AII) und seiner Fraktionen (AII1-X) verwendet. Die sedimentierten Blutkörperchen wurden zur Reinigung von Serumbestandteilen dreimal in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,2, aufgeschwemmt und anschließend 20 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert. Das Sediment resuspendierte ich danach jeweils auf das ursprüngliche Volumen. Die Freisetzung der Babesien aus den Erythrozyten erfolgte durch Aqua dest.-Hämolyse. Mit doppelt physiologischem PBS-Puffer, im Verhältnis des destillierten Wassers, wurde nach einer Minute die Isotonie

der Lösung wiederhergestellt, um eine Schädigung der Parasiten zu verhindern. Nach erfolgter Hämolyse zentrifugierte ich die freigesetzten Babesien, die Erythrozytenhüllen und die weißen Blutzellen 30 Minuten bei 20 000 Upm in einer auf + 2 °C gekühlten Ultrazentrifuge. Der Überstand wurde dekantiert und der verbleibende Bodensatz aus Erythrozytenhüllen und Leukozyten samt Babesien dreimal eingefroren und aufgetaut. Diese Suspension von abgetöteten Babesien stellt das somatische Gesamtantigen (AI3), auch Parasitensuspension, dar. Einen Teil der Suspension bewahrte ich für die spätere Immunisierung auf.

Der Rest wurde zur weiteren Aufbereitung des Gesamtantigens im Zellhomogenisator zerrieben. Nach Zusatz von PBS im Verhältnis 1 : 10 wurden die zerstörten Parasiten zur Extrahierung der löslichen Bestandteile 16 Stunden im Kühlschrank auf dem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 20 000 Upm die unlöslichen Bestandteile (AI2) von dem wäßrigen Totalextrakt (AI1) getrennt. Die nicht löslichen Bestandteile (AI2) konservierte ich durch Tiefgefrieren bei - 20 °C. Der wäßrige Totalextrakt (AI1) wurde in 2 ml-Portionen gefriergetrocknet aufbewahrt.

Das stoffwechsel- oder exoantigenhaltige Serum (AII) wurde dialysiert und anschließend lyophilisiert. Zum Immunisieren wurde es im Verhältnis 10 : 1 eingedickt.

Zur Isolierung des metabolischen Antigens fraktionierte ich das Serum hochparasitärer Mäuse an Sephadex G-200. Die Fraktionen benannte ich AII1-X. Das Gelbett hatte eine Höhe von 50 cm und einen Durchmesser von 2,5 cm. Als Elutionsflüssigkeit diente ein Phosphatpuffer (pH 7,2), die Durchflußgeschwindigkeit betrug 16 ml pro Stunde. Die Fraktionen wurden automatisch gesammelt und an Hand der geschriebenen Elutionskurven, die Messungen erfolgten bei 254 nm, ausgewertet. Die gesammelten Fraktionen dialysier-

te ich im Zellophanschlauch bei 4 °C gegen 1/10 physiologischen PBS-Puffer und lyophilisierte sie anschließend in 2 ml Portionen.

2. Immunisierung

Die Immunisierung mit den drei oben genannten somatischen Antigenen (AI1, 2, 3) sowie dem metabolischen Antigen (AII) und dessen Fraktionen (AI11-X) von *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* wurde an weiblichen NMRJ-Mäusen vorgenommen.

Für die Immunisierung mit dem wäßrigen Totalextrakt (AI1), dem serumlöslichen Antigen (AII) und dessen lyophilisierten Fraktionen (AI11-X), wurde bei der Rückverdünnung eine Konzentrierung der Babesienantigene von 10 : 1 angewendet. Diese sowie die unlöslichen Bestandteile (AI2) und das somatische Gesamtantigen (AI1) emulgierte ich für die Immunisierung im Verhältnis 1 : 1 in komplettem Freund'schen Adjuvans.

Kontrolltiere wurden subkutan entweder mit dem Gemisch Vollblut und Freund'schem Adjuvans zu gleichen Teilen oder mit PBS und Freund'schem Adjuvans als Emulsion immunisiert. Jede Maus erhielt 0,6 ml subkutan auf 2 Stellen des lateralen Brustbereiches verteilt.

Pro Antigen und Kontrollantigen bildete ich Gruppen mit je 8 - 12 Mäusen, so daß bei der späteren Belastung mit den vier Babesienarten mindestens zwei Tiere mit dem gleichen Parasiten infiziert werden konnten. Mit den verschiedenen metabolischen Antigenen von *B. rodhaini* und *B. musculi* konnten jeweils drei Tiere immunisiert und später infiziert werden. Zu jeder Gruppe kam noch eine Kontrollmaus, die weder immunisiert noch später belastet wurde. Ich kennzeichnete die Mäuse der gleichen Antigengruppe mit derselben gelben Nummer, wozu Pikrinsäure verwendet wurde. Für die anschließende Belastungsinfektion wurden die zwei, beziehungsweise drei Mäuse, die ich mit ein und derselben Babesienart infizierte,

ebenfalls mit der gleichen Nummer versehen, diesmal aber mit Karbolfuchsinrot nach Ziehl-Neelsen. Vier Wochen nach der Erstimmunisierung wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion mit dem entsprechenden Antigen (0,3 ml) ohne Zusatz von Adjuvans geboostert.

3. Serologische Methode für den Antikörpernachweis

Zum Nachweis der Antikörperbildung entnahm ich eine Woche nach dem Boostern ca. 0,5 ml Blut aus der Schwanzvene. Die abgetrennten Seren wurden mit Hilfe der Gegenstromelektrophorese, ausgeführt nach der Anleitung für den Amoebentest (Behringwerke AG), auf das Vorhandensein von Antikörpern untersucht. Die löslichen Antigene (AII, AII, AIII-X) wurden in die Lochreihe nahe der Kathode eingefüllt. Die Antiseren und Kontrollseren füllte ich in die anodwärts gerichtete Lochreihe. Durch ein puffergetränktes Filterpapier wurde der Kontakt zwischen den Gelplättchen und den Pufferkammern hergestellt. Die Versuchsdauer betrug 45 Minuten bei einem Gesamtstromdurchfluß von 80 mA und einer Spannung von 300 Volt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Platten zur nachträglichen Diffusion über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend 24 Stunden gewässert, getrocknet und mit Amidoschwarz angefärbt.

4. Belastungsinfektion

Zwei Wochen nach dem Boostern nahm ich bei sämtlichen Mäusegruppen die intraperitoneale Belastungsinfektion mit *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* in einer Infektionsdosis von 4×10^6 parasitierten Erythrozyten vor. Zusätzlich zu den bisherigen Kontrollen wurden pro Babesienart 10 nicht immunisierte Mäuse infiziert, die als weitere Kontrollen dienten.

Den Parasitämieverlauf verfolgte ich über 42 Tage.

In Tabelle 1 ist das Schema der durchgeführten Immunisierungen und Belastungsinfektionen zusammenfassend dargestellt.

<u>Immunisiert mit</u> <u>Antigenen von:</u>		<u>Belastungsinfektion mit:</u>			
		B.rod.	B.mus.	B.mic.	B.gal.
1. B. rodhaini					
2. B. musculi					
3. B. microti					
4. B. galagolata					
somatische Antigene	{ AI3 (wäß.Total.)				
	{ AI2 (unlös.Best.)				
	{ AI1 (som.Gesamt.)				
metabolische Antigene	{ AII (seruml.AG)				
	{ AIII1 (Fraktion1)				
	{ AIII2-6 (Fr. 2-6)				
Kontroll- antigene	{ KIII (k.Imm.)				
	{ KIV (Vollblut)				
	{ KV (Fr.Adj.)				

Tab. 1: Schema für die Belastungsinfektion der mit den verschiedenen Antigenen immunisierten Mäuse.

Die Blutaussstriche fertigte ich zuerst alle 2 Tage und nach einem Monat wöchentlich einmal, bei den infizierten Kontrollen täglich nach der Diff-Quik-Methode an. Von 200 Erythrozyten, die bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt wurden, ermittelte ich den %o-Satz der befallenen roten Blutkörperchen. Zur Veranschaulichung wurde der jeweilige Parasitämieverlauf in einer Kurve, sowie die sich abzeichnende verlängerte Präpatenz, Prämunität, spezifische oder Kreuzimmunität an Hand der vorher erwähnten Übersichtstabelle festgehalten. Als Vergleich dienten die Verlaufskurven der Parasitämie von nur mit Vollblut oder komplettem Freund'schem Adjuvans immunisierten, sowie die von unbehandelten Tieren.

B. Ergebnisse

1. Verlauf der Parasitämie nicht immunisierter Mäuse

a. negative Kontrolle (KIII/Abb. 1 a)

Die Präpatenzzeit von nicht immunisierten Tieren dauerte bei Belastung mit *B. rodhaini* und *B. musculi* 1 Tag, bei *B. microti*- bzw. *B. galagolata*-Infektion 2 bzw. 4 Tage. Dann stieg die Parasitämie im peripheren Blut der Mäuse steil an und erreichte Maximalwerte von 800 - 900 % am 7. Tag bei *B. rodhaini*, von 300 - 800 % am 10. Tag bei *B. musculi*, von 500 - 800 % am 11. Tag bei *B. microti* und von 280 - 320 % am 11. Tag bei *B. galagolata*. Anschließend sank die Parasitämie, außer bei der spätestens nach 9 Tagen tödlich verlaufenden Infektion von *B. rodhaini*, in dem Beobachtungszeitraum von 90 Tagen auf einen Durchschnittswert von 50 % bei Mäusen mit *B. musculi*, 30 % bei mit *B. microti* infizierten Tiere und 20 % bei Mäusen mit *B. galagolata*-Infektion ab.

b. Injektion von Vollblut (Kontrolle KIV/Abb. 1 b)

Die nächste Kontrolle bildeten Tiere, die mit komplettem Freund'schem Adjuvans und Vollblut behandelt wurden. Sie zeigten während des Zeitraumes von 42 Tagen als einzigen Unterschied gegenüber den Mäusen der vorangehenden Gruppe (KIII), daß durch die Vollblutinjektion nach Belastung mit den weniger virulenten Babesienarten *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata*, bei gleicher Präpatenzzeit, die maximale Parasitämie der Mäuse um 5 Tage, auf den 15. bzw. 16. Tag p.i., verzögert wurde.

c. Injektion von komplettem Freund'schem Adjuvans

(Kontrolle KV/Abb. 1 c)

Sämtliche Tiere dieser Gruppe entsprachen im Parasitämieverlauf, sowohl in Bezug auf die verlängerte Prä-

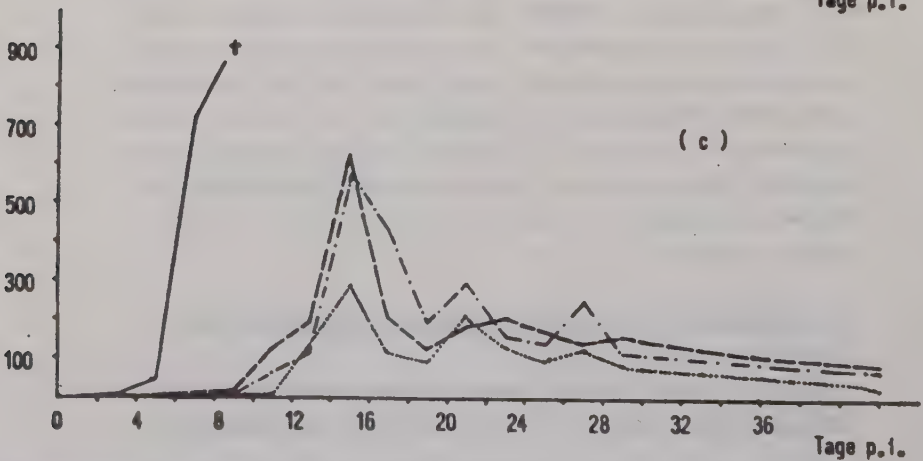
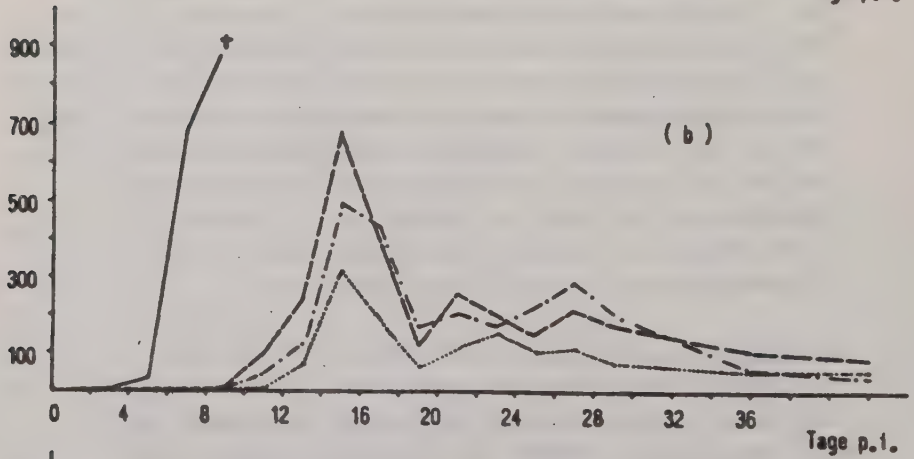
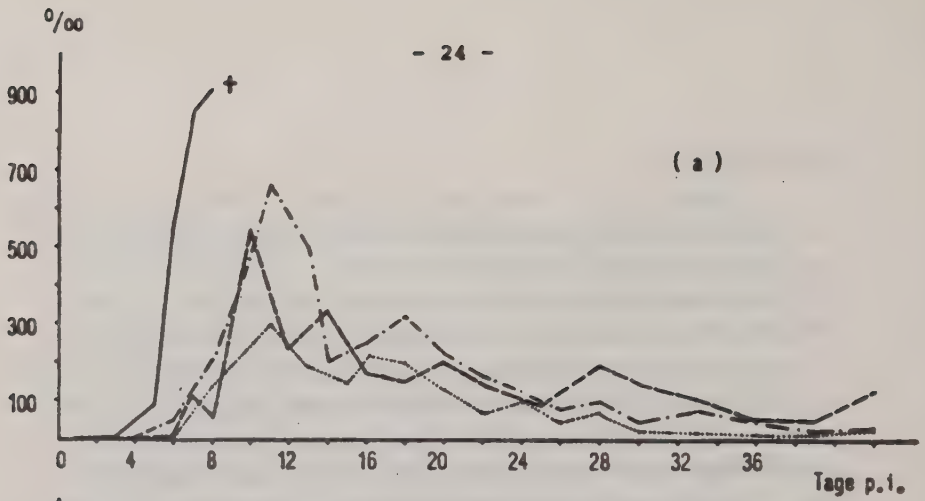


Abb.1: Parasitämie-Verlaufskurven von (a) nicht immunisierten, (b) mit Vollblut und (c) mit Freund'schem Adjuvans immunisierten Mäusen (Kontrollgruppen) nach Belastungsinfektion mit *Babesia rodhaini* (—), *B. musculi* (---), *B. microti* (---) und *B. galagolata* (....).
+ Exitus

patenz wie auch die maximale Parasitämie weitgehend den Mäusen, die ich mit Vollblut immunisierte (KIV) und jeweils mit dergleichen Babesienart infizierte.

d. Kontrollgruppe nicht immunisierter und nicht belasteter Tiere

Die nicht immunisierten und nicht belasteten Tiere zeigten über die gesamte Beobachtungszeit von 90 bzw. 42 Tagen keine Krankheitserscheinungen.

Die drei Kontrollen (KIII, IV, V) dienten als Vergleich für die mit spezifischen Antigenen immunisierten und anschließend mit den vier Babesienarten belasteten Tiere.

2. Immunogene Wirkung sämtlicher Teilantigene gegen die vier Babesienarten

Das Hauptkriterium für die immunogene Wirkung sämtlicher Teilantigene war die Verlaufskontrolle der Parasitämie.

a) Babesia rodhaini

Bei den Mäusen, die mit dem somatischen Gesamtantigen (AI3 - R/Abb. 2 a) immunisiert wurden, war im Gegensatz zu den Kontrollen (KIII, IV) die Präpatenz nach Belastung mit *B. rodhaini* um 6 Tage auf den 7. Tag p.i. verlängert. Die daran anschließende Parasitämie erfolgte genauso stürmisch, endete aber nicht tödlich, sondern erreichte am 11. Tag ihr Maximum bei 690 ‰ und fiel dann rasch ab. In den folgenden 20 Tagen sank der *B. rodhaini*-Spiegel unter 25 ‰ und erreichte erst am 42. Tag wieder 100 ‰. Die weniger virulenten Babesienarten *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* waren erst am 9. Tag p.i. im Inokulum nachzuweisen und stiegen ab dem 17. Tag bis zum 42. Tag langsam an. *B. musculi* und *B. microti* zeigten mit 240 ‰ am 36. Tag bzw. mit 260 ‰ am 42. Tag ihre höchste Parasitämie, *B. galagolata* stieg nur bis 95 ‰ am 42. Tag an.

Die Tiere, die mit dem 2. somatischen Antigen, den nicht löslichen Bestandteilen (AI2-R) immunisiert worden waren, hatten entsprechenden Parasitämieverlauf wie die vorher genannte Mäusegruppe (AI3-R). Die B. rodhaini-Parasitämie stieg nach einer Präpatenz von 7 Tagen schnell an, erreichte aber nur 480 ‰ am 11. Tag und pendelte dann, nach dem Rückgang der Parasitämie, 15 Tage lang ebenfalls unter 30 ‰. Erst ab dem 30. Tag kletterte sie wieder kontinuierlich auf 130 ‰ am 42. Tag. Ebenso zeigten auch die Mäuse, die mit B. musculi, B. microti und B. galagolata infiziert worden waren eine Präpatenz von 9 Tagen. Der Parasitämiespiegel stieg dann ab dem 17. Tag langsam und stetig auf die maximale Höhe am 36. Tag von 210 ‰ bei B. musculi, bzw. 130 ‰ bei B. galagolata an, B. microti erreichte seinen größten Wert am 42. Tag mit 140 ‰.

Die Mäusegruppe, die mit dem 3. somatischen Antigen, dem wäßrigen Totalextrakt (AI1-R), immunisiert worden war und mit B. rodhaini belastet wurde, hatte ähnlich der AI3-R Tiergruppe nach einer Präpatenzperiode von 5 Tagen teils nur eine sehr schwache Parasitämie von 220 ‰ am 9. Tag, teils aber starben die Tiere am gleichen Tag. Nach dem Parasitämierückgang schwankte der Babesienbefall zwischen 10 und 40 ‰ und stieg erst gegen Ende des Beobachtungszeitraumes wieder auf 80 ‰ am 42. Tag an. Zur Erprobung der Infektiosität von B. rodhaini entnahm ich einem Tier am 29. Tag, bei einer Parasitämie von 10 ‰, Blut und infizierte damit nicht immunisierte Mäuse. B. rodhaini ging an, führte aber nicht wie gewöhnlich am 7., sondern erst am 10 - 15. Tag zum Exitus des Tieres. Die Parasitämiekurve von B. musculi, B. microti und B. galagolata stieg nach einer Präpatenz von 7 Tagen sehr zögernd an und erreichte am 36. Tag bei B. microti mit 150 ‰, bei B. galagolata mit 220 ‰ und bei B. musculi mit 340 ‰ den Höhepunkt.

Die mit serumlöslichem Gesamtantigen (AII-R) immunisierten Tiere zeigten, daß die Belastungsinfektion mit *B. rodhaini*, nach der gleichen Präpatenzzeit von 5 Tagen, am 9. Tag den Tod der Mäuse verursachte. Bei *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* dauerte die Präpatenz 7 Tage. Ab dem 17. Tag stieg, entsprechend der Tiere bei AI3-R, die Parasitämie über 1 % und erreichte bei den Mäusen, die mit *B. galagolata* infiziert wurden, bereits am 23. Tag den Maximalwert von 160 %, von dem sie nur langsam auf 90 % am 42. Tag abfielen. Ähnlich schnell vermehrten sich auch *B. musculi* und *B. microti*; diese Tiere hatten ihr Maximum aber erst am 36. Tag mit 230 % bzw. 190 %.

Die Parasitämiewerte der Mäuse, die mit Fraktionen des serumlöslichen Gesamtantigens immunisiert worden waren, faßte ich in zwei Kurven zusammen. Jeweils die Tiergruppe, die ich mit der Fraktion 1 immunisierte, wurde als eine Kurve dargestellt. Die 2. Parasitämiekurve umfaßte die Tiergruppen, die mit den restlichen Fraktionen immunisiert worden waren.

Nach Belastung der mit Fraktion 1 immunisierten Tiere (AIII-R/Abb. 2 b) mit *B. rodhaini* entwickelte sich bei den Mäusen nach einer Präpatenzzeit von 4 Tagen eine maximale Parasitämie von 360 % am 8. Tag. Bei einem Tier führte die Infektion am 12. Tag sogar zum Exitus. Nach dem Abfall variierte die Parasitämiehöhe bei den überlebenden Mäusen zwischen 1 und 100 %. Der 2. Maximalwert wurde stets am 24. Tag mit 80 % p.i. festgestellt. Bei den Tieren, die ich mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* belastete, dauerte die Präpatenz 8 Tage. Der Parasitenbefall stieg dann bis zum 16. Kontrolltag bei *B. musculi* und *B. galagolata* auf 290 bzw. 180 % an, *B. microti* erreichte den Maximalwert erst am 18. Tag mit 300 %. Nach einem kurzzeitigen Abfall bildete sich noch ein 2. Parasitämiegipfel am 28. Tag für *B. microti* mit 240 % und *B. galagolata* mit 180 %, *B. musculi* erreichte erst am 30. Tag 200 %.

‰

- 28 -

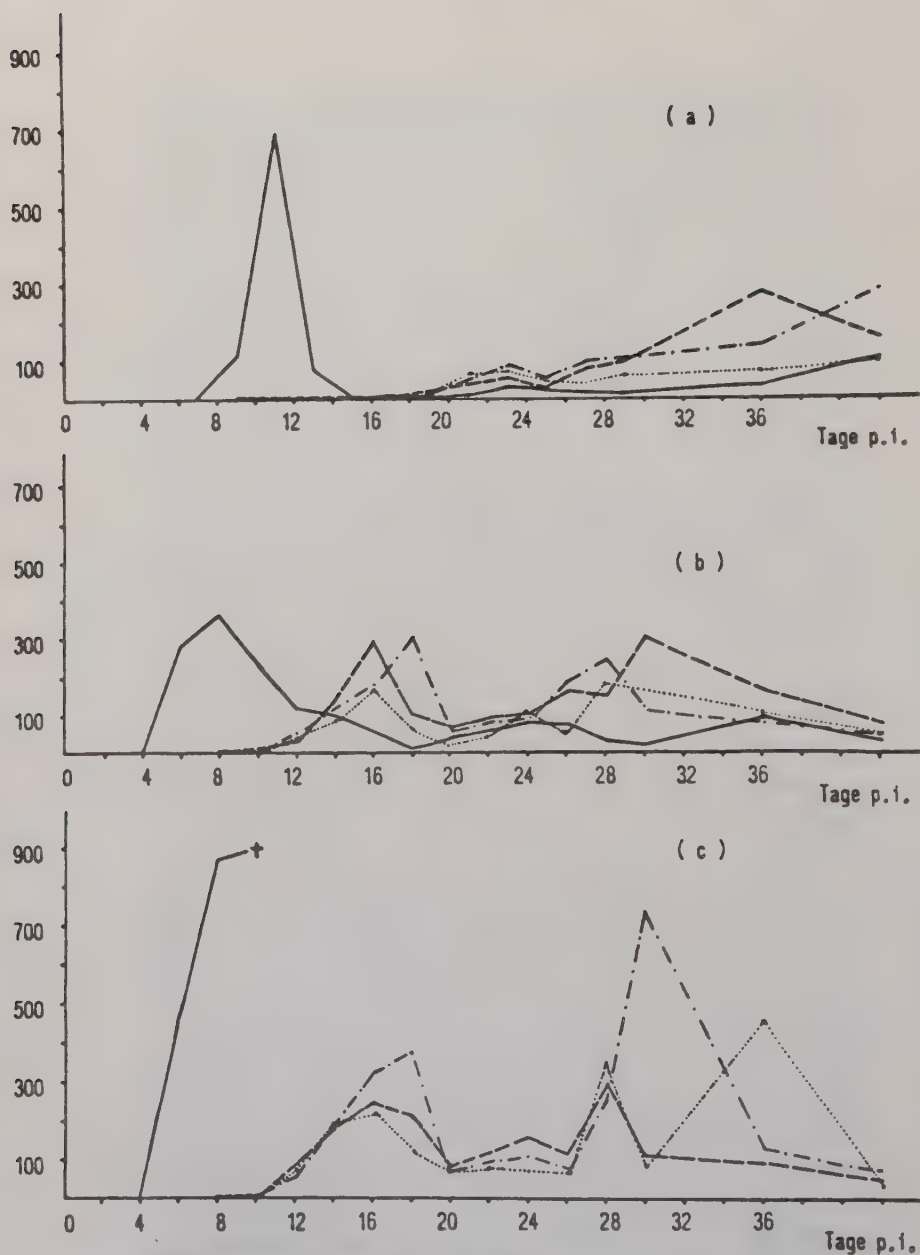


Abb.2: Parasitämie-Verlaufskurven von (a) mit somatischem Gesamtantigen, (b) mit der Fraktion 1 und (c) mit den Fraktionen 2-6 eines serumlöslichen (metabolischen) Antigens von *Babesia rodhaini* immunisierten Mäusen nach Belastungsinfektion mit *B.rodhaini* (—), *B.musculi* (— —), *B.microti* (---) und *B.galagolata* (···). + Exitus

Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes von 42 Tagen variierten die drei Babesienarten zwischen 40 und 70 ‰.

Die Mäuse, die mit den Fraktionen 2 - 6 (AII2-6 R/ Abb. 2 c) immunisiert worden waren und anschließend mit *B. rodhaini* belastet wurden, zeigten ebenfalls eine Präpatenzzeit von 4 Tagen. Die Parasitämie der Tiere stieg dann entsprechend den Kontrollen an und hatte bei 800 - 900 ‰ am 10. Tag den Tod zur Folge. Der Infektionsverlauf von *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* glich dem der Fraktion 1. Lediglich die Werte der 2. Parasitämie am 28. Tag von *B. musculi* mit 295 ‰ bzw. am 30. Tag von *B. microti* mit 740 ‰ und am 36. Tag von *B. galagolata* mit 460 ‰ lagen erheblich über den Ergebnissen bei der Fraktion 1. Diese hohen Durchschnittswerte der Mäuse, die mit den Fraktionen 2 - 6 immunisiert worden waren verbargen den späten, wie überraschenden Exitus einzelner Tiere, die ich mit *B. microti* bzw. *B. galagolata* belastete.

b. Babesia musculi

Bei den Tieren, die ich mit dem somatischen B. musculi-Gesamtantigen (AI3-Mu/Abb. 3 a) immunisierte, verkürzte sich die Präpatenz nach *B. rodhaini*-Belastung im Vergleich zum somatischen *B. rodhaini*-Gesamtantigen (AI3-R) um zwei auf 5 Tage. Die daran anschließende, stürmische Parasitämie entsprach den Kontrollen und endete bereits am 9. bzw. 11. Tag mit dem Tod. Bei den weniger virulenten Arten *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* betrug die Präpatenz 9 Tage. Die Parasitämie der Mäuse stieg erst ab dem 17. Tag über 1 ‰ an. *B. galagolata* erreichte am 23. Tag, *B. microti* am 25. Kontrolltag den Maximalwert von 80 bzw. 180 ‰. Beide pendelten sich dann bis zum 42. Tag auf 50 - 60 ‰ ein. *B. musculi* dagegen hatte seine höchste Parasitämie von 110 ‰ am

36. Tag und fiel in der darauffolgenden Woche auf 80 % ab.

Die Mäuse, die mit dem 2. somatischen Antigen, den nicht löslichen Bestandteilen (AI2-Mu) immunisiert worden waren, zeigten nach Belastung nahezu deckungsgleichen Parasitämieverlauf wie die eben besprochene Tiergruppe (AI3-Mu). Die B. rodhaini-Infektion endete nach einer Präpatenz von 5 Tagen ebenfalls am 9. Tag mit dem Tod der Tiere. Auch die Präpatenz von B. musculi, B. microti und B. galagolata betrug 9 Tage und der Infektionsverlauf entsprach insgesamt der letzten Mäusegruppe, lediglich die Parasitämiehöhe bei B. musculi stieg am 36. Tag auf 120 % an und B. microti erreichte erst am 42. Tag den Maximalwert von 230 %.

Die Parasitämiekurve der Tiere, die ich mit dem wäßrigen Totalextrakt (AI1-Mu) immunisierte, deckte sich im wesentlichen mit den Werten der Tiere, die mit dem somatischen Gesamtantigen (AI3-Mu) immunisiert worden waren. Es bestand lediglich ein Unterschied der Parasitämiehöhe von B. musculi und B. microti am 36. Tag, der hier 130 bzw. 170 % betrug.

Auch die mit serumlöslichem Gesamtantigen (AII-Mu) immunisierten Tiere starben nach B. rodhaini-Infektion, bei gleicher Präpatenzzeit von 5 Tagen, am 9. Tag.

Die Mäuse, die ich mit B. musculi, B. microti und B. galagolata belastete, hatten eine Präpatenz von 7 Tagen. Erst ab dem 17. Kontrolltag stieg ihre Parasitämie über 1 % und verlief dann ähnlich der Tiergruppe, die mit somatischem Gesamtantigen (AI3-Mu) immunisiert worden war. Bereits am 23. Tag p.i. erreichten die mit B. microti sowie die mit B. galagolata infizierten Mäuse ihren Maximalwert mit 210 bzw. 180 %. Danach pendelte die Parasitämie bei beiden Babesienarten um 70 %. Die Parasitämiewerte von B. musculi dagegen stiegen bis zum 27. Tag kontinuierlich auf 250 % an und fielen nur sehr langsam auf 180 % am 42. Tag ab.

Bei der Auftrennung des serumlöslichen Gesamtantigens in seine Fraktionen zeigten die Mäuse, die mit der Fraktion 1 (AIII-Mu/Abb. 3 b) immunisiert worden waren, nach Belastung mit *B. rodhaini* eine Präpatenzzeit von 4 Tagen. Die Parasitämie stieg dann entsprechend den Kontrollen sehr steil bis ca. 850 % an und endete am 10 bzw. 12. Tag p.i. mit dem Exitus der Tiere. Nach der Belastungsinfektion der Mäusegruppe mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* betrug die Präpatenz 8 Tage. Die Parasitämiekurve stieg bis zum 14. Tag bei *B. musculi* auf 300 %, bei *B. galagolata* auf 180 % und variierte nach dem Abfall bei *B. musculi* um 100 %, bei *B. galagolata* um 70 %. Tiere, die mit *B. microti* infiziert worden waren, entwickelten einen etwas langsameren Parasitämieanstieg. Am 16. Tag erreichte er das 1. Maximum bei 200 %, fiel bis auf 50 % am 26. Tag ab und bildete am 30. Tag erneut ein Maximum mit 190 %. Bis zum 42. Tag sank dann die Parasitämie bei den Mäusen wieder auf 80 % ab.

Nach Belastung der mit den Fraktionen 2 - 6 (AII2-6 Mu) immunisierten Tiere mit *B. rodhaini* hatten diese ebenfalls eine Präpatenz von 4 Tagen. Auch der Parasitämieverlauf entsprach der Fraktion 1 (AIII-Mu), der bei 850 - 900 % am 10. Tag mit dem Tod endete. Der Parasitenbefall der Mäuse, die ich mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* belastete, stieg nach einer einheitlichen Präpatenzzeit von 8 Tagen ähnlich steil wie bei den Kontrollen an und erreichte am 14. Tag bei *B. musculi* 530 %, bei *B. galagolata* 315 %. *B. microti* hatte seinen Parasitämiehöhepunkt erst am 18. Tag mit 495 %. Danach fielen die Parasitämiewerte der Mäuse, die mit den drei Babesienarten gechallenged worden waren, bis zum 30. Tag auf 100 bis 50 % ab. Erst am 36. Tag zeichnete sich bei

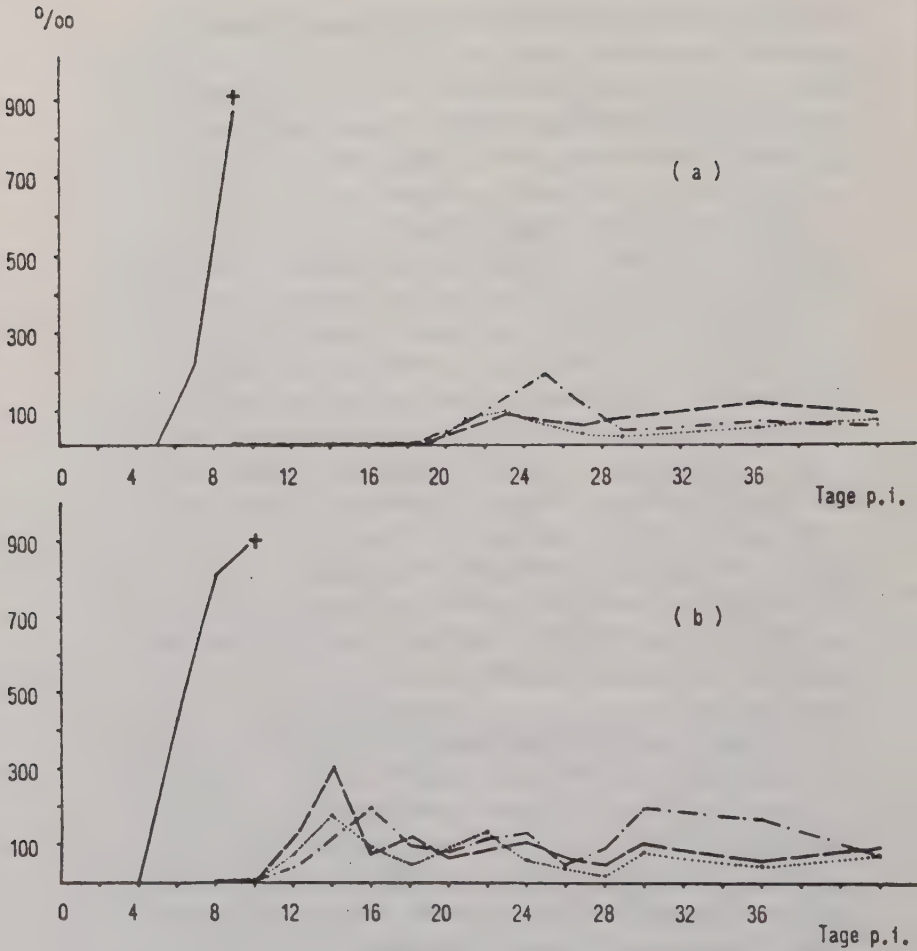


Abb.3: Parasitämie-Verlaufskurven von (a) mit somatischem Gesamtantigen und (b) mit der Fraktion 1 eines serumlöslichen (metabolischen) Antigens von Babesia musculi immunisierten Mäusen nach Belastungsinfektion mit B.rodhaini (—), B.musculi (— — —), B.microti (---) und B.galagolata (...). + Exitus

allen Tieren ein 2. Maximum ab, mit 200 % bei *B. musculi*, 280 % bei *B. microti* und 75 % bei *B. galagolata*. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes von 42 Tagen ging die Parasitämie dann wieder auf die Ausgangswerte vom 30. Tag zurück. Ähnlich überraschend wie bei den mit serumlöslichem *B. rodhaini*-Antigen der Fraktionen 2 - 6 (AI12-6 R) immunisierten Mäusen, führte auch hier, jedoch nur bei zwei Tieren die mit *B. galagolata* belastet worden waren, die Parasitämie am 36. Tag bei circa 290 % zum Tod.

c) Babesia microti

Bei den Mäusen, die ich mit dem somatischen Gesamtantigen (AI3-Mi/Abb. 4 a) immunisierte, dauerte die Präpatenz nach der Challengeinfektion mit *B. rodhaini* 4 Tage. Sie verkürzte sich damit im Vergleich zu den Tieren, die ich mit somatischem *B. musculi*-Gesamtantigen (AI3-Mu) immunisierte, um 1 Tag. Nach anschließendem, sehr steilem Parasitämieanstieg im peripheren Blut, entsprechend den Kontrollen, führte die Belastungsinfektion mit *B. rodhaini* schon am 8. bzw. 10 Tag zum Exitus der Mäuse.

Die weniger virulenten Babesienarten *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* konnten erst am 10. Tag im Inokulum nachgewiesen werden. Ab dem 16. Tag stieg die Parasitämie der Tiere über 1 % und bildete bei *B. musculi* und *B. microti* unterschiedlich hohe Peaks, am 22. Tag mit einer Parasitämie von 160 bzw. 100 %, am 26. Tag mit 210 bzw. 90 % und am 36. Tag mit 200 %, bzw. bei *B. microti* am 42. Tag mit 180 %. Die mit *B. galagolata* infizierten Mäuse zeigten dagegen eine langsame Parasitenzunahme bis zum 28. Tag mit einem Maximalwert von 120 %, dann variierte die Parasitämie zwischen 50 und 80 %.

Die Tiere, die mit dem 2. somatischen Antigen, den nichtlöslichen Bestandteilen (AI2-Mi) immunisiert

worden waren, zeigten nach Belastung mit den vier Babesienarten, abgesehen vom *B. rodhaini*-Anstieg, entsprechende Parasitämiekurven, wie die letzte Tiergruppe (AI3-Mi). Die *B. rodhaini*-Parasitämie stieg nach einer Präpatenz von 4 Tagen allerdings etwas langsamer bis auf 450 % am 10. Tag an und erst danach nahm die Virulenz stark zu und führte dadurch bei den Tieren am 12. bzw. 14. Tag p.i. zum Tod.

Die Mäuse, die ich mit *B. musculi* infizierte, hatten nach einer Präpatenz von 8 Tagen ebenfalls drei Maximalwerte und zwar am 22. Tag mit 140 %, am 26. Tag mit 150 % und am 36. Tag mit 160 %. Auch bei den Tieren, die mit *B. microti* wie *B. galagolata* gechallenged worden waren, konnten erst ab dem 8. Tag Parasiten im Blutaussstrich festgestellt werden, die bis zum 16. Kontrolltag nicht über 1 % anstiegen. Die drei Peaks im Parasitämieverlauf bei *B. microti* waren am 22., 28. und 24. Tag jedoch nur bei 90, 80 und 70 %. Die *B. galagolata*-Parasitämie stieg ebenfalls bis zum 26. Tag an und fiel dann auf 30 - 50 % ab.

Bei den Tieren, die mit dem wässrigen Totalextrakt (AI1-Mi) immunisiert worden waren, dauerte die Präpatenz bei mit *B. rodhaini* infizierten Mäusen 4 Tage. Der Parasitämieverlauf überraschte jedoch, da nach relativ langsamem Anstieg bis 670 % am 8. Tag der Parasitenbefall nicht zum Exitus führte, sondern auf 4 % am 16. Tag abfiel und anschließend zwischen 1 und 60 % pendelte. Eine ähnliche Parasitämiekurve war bisher nur bei den mit somatischem *B. rodhaini*-Gesamtantigen (AI3-R) immunisierten Mäusen zu beobachten. Die Präpatenz, wie die Parasitämiekurven aller Tiere, die ich mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* belastete, zeigten nur unwesentliche Abweichungen von der vorletzten Mäusegruppe (AI3-Mi). Zur Vermeidung von Wiederholungen verzichte ich deshalb auf die Beschreibung.

Die Mäuse, die ich mit serumlöslichem Gesamtantigen (AII-Mi) immunisierte, hatten eine Präpatenzzeit nach B. rodhaini-Belastung von 4 Tagen. Die anschließende Parasitämie stieg steil an und führte am 8. bzw. 10. Tag zum Tod. Nach der Belastungsinfektion der Tiere mit B. musculi, B. microti und B. galagolata konnte ich im Blutaussstrich erst nach 8 Tagen Babesien nachweisen. Der Parasitämieverlauf unterschied sich, bezogen auf die ähnlichen Kurven, bei den mit somatischem Gesamtantigen (AII3-Mi) immunisierten Tieren in der Höhe der Peaks, die bei B. musculi am 22. Tag bei 200 ‰, am 26. Tag bei 220 ‰ und am 36. Tag bei 310 ‰ waren. B. microti erreichte die maximale Parasitämie am 26. Tag mit 200 ‰, während B. galagolata gar nur auf 100 ‰ am 24. Tag und am 30. Tag anstieg.

Eine weitere Tiergruppe wurde mit dem serumlöslichen Teilantigen, der Fraktion 1 (AII1-Mi/Abb. 4 b), immunisiert. Die Präpatenzzeit dieser Mäuse war bei Belastung mit B. rodhaini auf 3 Tage verkürzt. Nach anfänglich rapid ansteigender Parasitämie verringerte sich die Parasitenvermehrung ab dem 7. Kontrolltag, führte aber dennoch am 11. Tag p.i. zum Exitus der Tiere. Eine einheitliche Präpatenz von 7 Tagen zeigten die mit B. musculi, B. microti und B. galagolata belasteten Tiere. Daran anschließend entwickelte sich schnell eine Parasitämie, die ein Maximum bei B. musculi am 13. Tag mit 360 ‰ und bei B. microti bzw. B. galagolata am 15. Tag mit 630 bzw. 290 ‰ bildete. Nach dem Abfall variierte die Parasitenzahl im peripheren Blut bei B. musculi um 100 ‰, bei B. microti um 50 ‰ und bei B. galagolata um 30 ‰.

Die Tiere, die mit den Fraktionen 2 - 6 (AII2-6 Mi) immunisiert worden waren, zeigten einen entsprechenden Parasitämieverlauf wie die Mäusegruppe der Fraktion 1. Nach Belastung mit B. rodhaini dauerte die Prä-

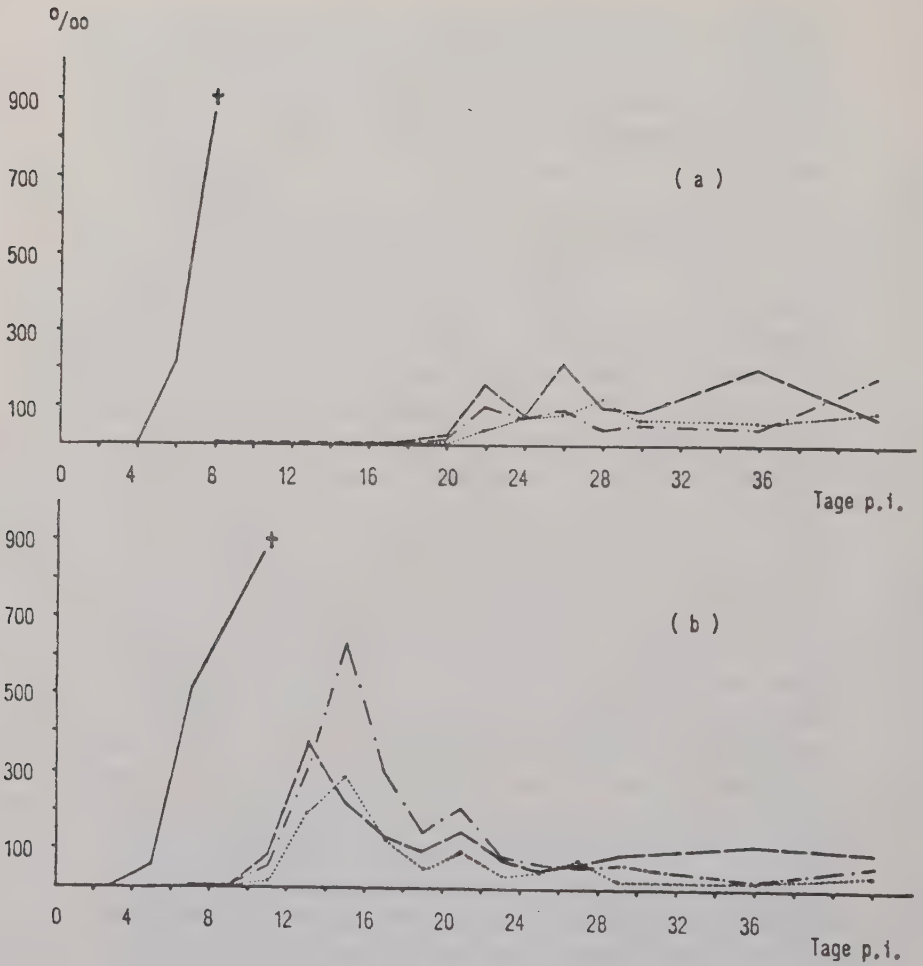


Abb. 4: Parasitämie-Verlaufskurven von (a) mit somatischem Gesamtantigen und (b) mit der Fraktion 1 eines serumlöslichen (metabolischen) Antigens von *Babesia microti* immunisierten Mäusen nach Belastungsinfektion mit *B. rodhaini* (—), *B. musculi* (---), *B. microti* (---) und *B. galagolata* (...). + Exitus

patenzzeit 3 Tage. Die Parasitämie bei den Tieren stieg in etwa genauso an und endete am 8. bzw. 10 Tag mit dem Tod. Die Mäuse, die mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* gechallenged wurden, hatten wie die letzte Gruppe (AIII-Mi) eine Präpatenz von 8 Tagen.

Auch der Parasitämieverlauf bei allen drei Babesienarten war nahezu deckungsgleich, jedoch das Maximum am 15. Tag bei *B. musculi* bei 450 ‰, bei *B. microti* bei 635 ‰ und bei *B. galagolata* bei 280 ‰. Damit glichen die Parasitämiekurven dieser Mäuse auch den Kontrollkurven.

d. Babesia galagolata

Bei den Tieren, die mit dem somatischen Gesamtantigen (AI3-G/Abb. 5 a) immunisiert worden waren, betrug die Präpatenzperiode nach Belastung mit *B. rodhaini* ebenfalls wie bei der Mäusegruppe, die ich mit somatischem *B. microti*-Antigen (AI3-Mi) immunisierte, 4 Tage. Die daran anschließende, stürmische Parasitämie entsprach den Kontrollen und endete bereits am 8. bzw. 10 Tag mit dem Exitus der Tiere. Die weit weniger virulenten Babesienarten *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* hatten eine Präpatenzzeit von 8 Tagen. Ab dem 16. Tag stieg die Parasitämie über 1 ‰ und bildete nach stetiger Zunahme am 30 Tag bei *B. musculi* mit 290 ‰, bei *B. microti* und *B. galagolata* am 26. Tag mit 90 bzw. 80 ‰ ein Maximum. Anschließend fiel die Parasitämiekurve von den Mäusen, die mit *B. musculi* infiziert worden waren, auf 60 ‰. Die Parasitämie von mit *B. microti* bzw. *B. galagolata* belasteten Tieren variierte um 50 bzw. 10 ‰.

Der Infektionsverlauf bei den Mäusen, die ich mit dem 2. somatischen Antigen, den nichtlöslichen Bestandteilen (AI2-G) immunisierte, war ähnlich der letzten mit somatischem Gesamtantigen immunisierten Tiergruppe (AI3-G). Die Belastung mit *B. rodhaini* führte nach einer Präpatenz von 4 Tagen am 8. Tag zum Tod.

Die Mäuse, die ich mit den anderen drei, den weniger virulenten Babesienarten infizierte, hatten eine Präpatenzperiode von 8 Tagen, der Parasitämieverlauf der Tiere unterschied sich von der letzten Mäusegruppe dadurch, daß die Tiere, die mit *B. musculi* bzw. *B. galagolata* belastet worden waren, bereits am 28. Tag mit 220 % bzw. am 26. Tag mit 60 % ein Maximum bildeten. Die Mäuse, die mit *B. microti* gechallenged worden waren, erreichten erst am 30. Tag ihren Parasitämiegipfel von 150 %.

Bei den Tieren, die ich mit dem wäßrigen Totalextrakt (AI1-G) immunisierte, betrug die Präpatenz nach Belastung mit *B. rodhaini* ebenfalls 4 Tage. Die Parasitämie stieg erneut entsprechend den Tieren, die mit wäßrigem *B. microti*-Totalextrakt (AI1-Mi) immunisiert worden waren und ebenfalls mit *B. rodhaini* belastet wurden, nur bis 450 % am 8. Tag an, fiel dann ab und pendelte bis zum 42. Tag zwischen 10 und 80 %. Die Parasitämiekurven der weiteren Mäuse, die mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* gechallenged wurden, wichen nur in den Maximalwerten von der vorletzten Tiergruppe, die ich mit somatischem Gesamtantigen (AI3-G) immunisierte, ab. *B. musculi* und *B. microti* erreichten am 26. Tag 350 bzw. 390 %, *B. galagolata* am 28. Tag 220 %.

Auch die mit serumlöslichem Gesamtantigen (AI1-G) immunisierten Tiere verhielten sich entsprechend den Mäusen, die mit somatischem Gesamtantigen (AI3-G) immunisiert worden waren und mit *B. rodhaini* belastet wurden.

Die Präpatenz betrug wieder 4 Tage und die anschließende Parasitämie führte am 8. bzw. 10. Tag p.i. zum Exitus. Die Parasitämiekurven der mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* infizierten Mäuse entsprachen dem Verlauf der AI3-Mäusegruppe, hatten aber erst am 36. Tag ihren Höhepunkt.

Nach **Fraktionierung des serumlöslichen Gesamtantigens** und Immunisierung der Mäuse mit Fraktion 1 (AIII-G/ Abb. 5 b) zeigte sich bei Belastung mit *B. rodhaini* eine Präpatenz von 3 Tagen und eine ähnliche Parasitämie wie bei den Kontrolltieren, die hier jedoch erst am 11. Tag den Tod der Tiere zur Folge hatte. Bei Mäusen, die mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* belastet worden waren, dauerte die Präpatenz 7 Tage. Der Parasitenbefall stieg dann im peripheren Blut bis zum 15. Tag auf den Maximalwert von 510 ‰ bei *B. musculi*, von 780 ‰ bei *B. microti* und von 320 ‰ bei *B. galagolata*. Die Parasitämie bei mit *B. microti* und *B. galagolata* infizierten Tieren fiel anschließend kontinuierlich auf 20 bzw. 30 ‰ am 42. Tag ab, während die Parasitämiekurve von *B. musculi* am 36. Tag einen neuen Peak von 170 ‰ aufwies und erst dann auf 80 ‰ zurückging.

Die Mäuse, die mit den restlichen Fraktionen 2 - 6 (AII2-6 G) immunisiert worden waren und die ich anschließend mit *B. rodhaini* belastete, hatten eine Präpatenzzeit von 3 Tagen. Die Parasitämiekurve dieser Tiere stieg noch schneller an als bei den Mäusen, die mit Fraktion 1 immunisiert worden waren; die Tiere starben bereits am 9. Tag p.i. Die Präpatenz wie der Parasitämieverlauf der mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* belasteten Mäuse entspricht dem der letzten Tiergruppe (AIII1-G). Die Maximalwerte wurden ebenfalls am 15. Kontrolltag erreicht und lagen bei *B. musculi* und *B. microti* bei 460 ‰, bei *B. galagolata* bei 220 ‰. Bis zum 42. Tag fiel dann bei allen Mäusen die Parasitämie auf Werte zwischen 30 und 75 ‰ ab.

Die ausgewählten Graphiken, die dem jeweiligen Text zugeordnet wurden, sollen den beschriebenen Parasitämieverlauf nach Immunisierung der Mäuse mit den genannten Teilantigenen und der anschließenden Belastung mit

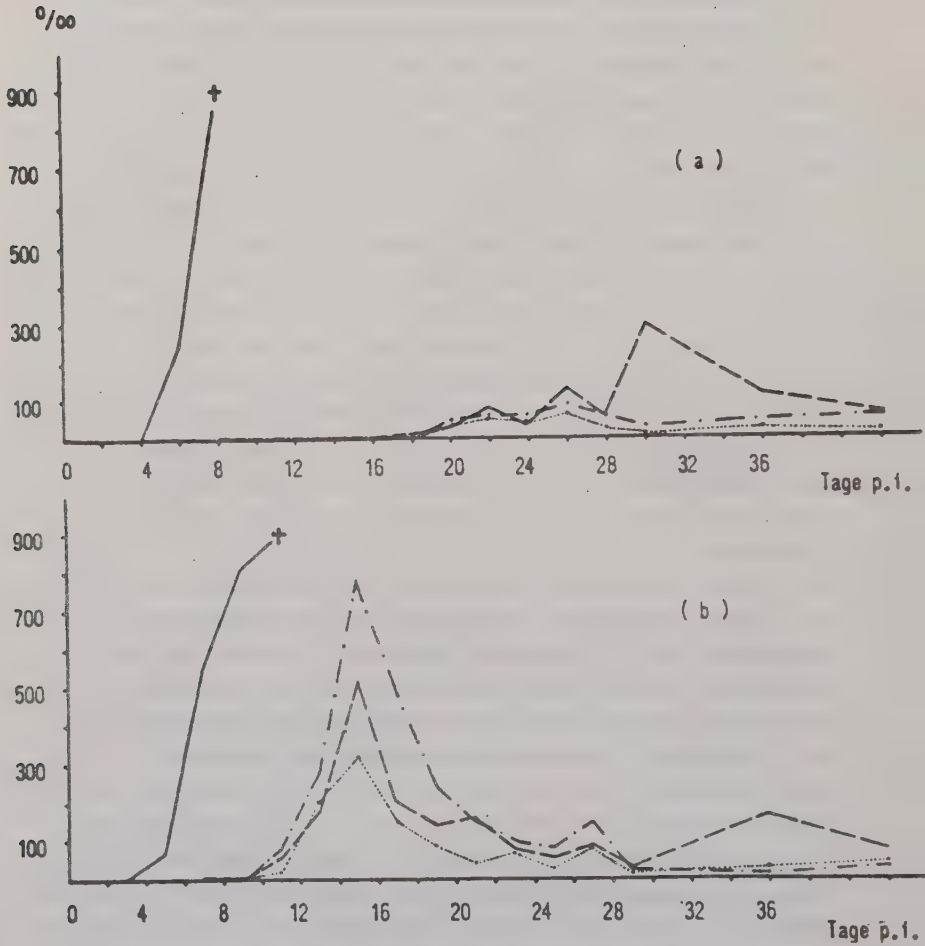


Abb.5: Parasitämie-Verlaufskurven von (a) mit somatischem Gesamtantigen und (b) mit der Fraktion 1 eines serumlöslichen (metabolischen) Antigens von Babesia galagolata immunisierten Mäusen nach Belastungsinfektion mit *B.rodhaini* (—), *B.musculi* (---), *B.microti* (---) und *B.galagolata* (····). + Exitus

B. rodhaini, *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* verdeutlichen. Dadurch soll die immunogene Wirkung, die von den einzelnen Antigenen ausgeht, besser verglichen werden können.

Ergänzend möchte ich darauf hinweisen, daß bei allen Belastungsinfektionen der immunisierten Mäuse mit *B. rodhaini* bereits 1 - 2 Tage nach der maximalen Parasitämie, bei Challengeinfektionen mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* erst nach 30-tägiger Parasitämie im Blutaussstrich vermehrt Retikulozyten beobachtet wurden.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Babesien im Serum immunisierter Mäuse wurde mit der Gegenstromelektrophorese vorgenommen. Eine Woche nach Abschluß der Immunisierung (1 Woche nach der Boosterung) bildete das Antiserum sämtlicher Mäuse, die mit einem Babesiaantigen immunisiert worden waren, gegen das serumlösliche Gesamtantigen aller vier verwendeten Babesienarten positive Reaktionen. Die Seren der Kontrolltiere zeigten keine Reaktionen. Die Ausbildung von art- wie gattungsspezifischen Präzipitatbanden beweist, daß durch vorangegangene Immunisierung mit Teilantigenen einer Babesienart art- wie gattungsspezifische Antikörper gebildet wurden.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Durch Immunisierung mit somatischen und metabolischen Antigenen von *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* sollte deren Immunogenität gegen die vier genannten Babesienarten an Hand der Parasitämie untersucht werden. Als Kontrolle dienten nicht immunisierte bzw. die mit Fremdeiweiß behandelten Tiere, die ich anschließend ebenfalls mit den vier Babesienarten belastete. An Hand der Kontrollkurven wurde dann durch Vergleich die immunogene Wirkung der einzelnen Teilantigene abgeklärt.

Bei den Kontrolltieren konnte ich bereits durch die unspezifische Immunisierung mit Vollblut bzw. Freund'schem Adjuvans nach Belastung mit den weniger virulenten Babesienarten *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* eine verlängerte Präpatenz sowie einen um 4 Tage später auftretenden Parasitämiegipfel gegenüber den nicht immunisierten Tieren feststellen. Dies läßt vermuten, daß durch Injektionen von unspezifischem Eiweiß eine Stimulierung des RES bewirkt wird und somit bei den weniger virulenten Babesienarten die Präpatenz verlängert bzw. die Parasitämiegipfel zeitlich verschoben auftraten. Nach Untersuchungen an *Trypanosoma lewisi* nimmt D'Alesandro (1972) an, daß es bei der langsamen Vermehrung weniger pathogener Arten zu einer Neutralisierung des Antigens durch das RES kommt. Über ähnliche Versuche an Babesien konnte ich keine Angaben in der Literatur finden, jedoch könnte man annehmen, daß bei diesen Protozoen ein vergleichbarer Mechanismus bestehen könnte.

Die Parasitämie-Verlaufskurven von mit den verschiedenen Babesienantigenen immunisierten und anschließend belasteten Mäusen lassen die folgende Aussage zu. Die somatischen *B. rodhaini*-Antigene zeigten die beste immunisierende Wirkung nach Belastung mit allen 4 Babesienarten. Auffallend war die ähnliche Schutzwirkung der

dreier Parasitenantigene, nämlich des somatischen Gesamtantigens, der unlöslichen Bestandteile und des wäßrigen Totalextraktes. Stets konnte erheblich verlängerte Präpatenz und auch Prämunizität beobachtet werden. Da dies nur bei den *B. rodhaini*-Antigenen der Fall war, mag die Ursache in der starken Virulenz dieser Babesienart zu suchen sein. Leider finden sich in der Literatur keine Angaben über vergleichende Untersuchungen. Die Beobachtung, daß das somatische Gesamtantigen weitgehend gleiche Immunogenität wie die nichtlöslichen Bestandteile bewirkte und der wäßrige Totalextrakt dabei die Mäuse gegen eine Belastungsinfektion durch *B. rodhaini* nur zu 50 % schützt, erweckt den Anschein, daß die Zellstruktur der Babesien selbst eine starke Antigenität besitzt. Auch MAHONEY (1967) und PHILLIPS (1967) kommen bei ihren Untersuchungen mit *B. argentina* bzw. *B. rodhaini* zu dem Ergebnis, daß die wichtigsten Antigene für die Erzeugung einer Immunität an den Parasiten selbst gebunden sind.

Durch Immunisierung mit den somatischen Antigenen aller 4 Babesienarten und Belastungsinfektion mit ebenfalls diesen 4 Arten konnte ich an Hand der Parasitämiekurven weiter feststellen, daß jeweils das homologe Antigen den besten Schutz gegen die entsprechende Babesienart hervorruft. MAHONEY (1967) hatte ein ähnliches Ergebnis; er beobachtete bei mit *B. argentina* immunisierten Rindern und anschließender Belastung mit der gleichen Babesienart einen Erythrozytenbefall von maximal 30 % im peripheren Blut. Er sprach ebenfalls dem somatischen Antigen eine starke immunisierende Wirkung gegen die homologe Belastungsinfektion zu. SOLTYS (1973) dagegen erzielte bei der gleichen Versuchsanordnung und mit derselben Babesienart jedoch nur Teilimmunität gegen die homologe *B. argentina*-Infektion.

Die mit somatischen *B. musculi* bzw. *B. microti* bzw. *B. galagolata*-Antigenen immunisierten Mäuse zeigten gegen die *B. rodhaini*-Belastungsinfektion in keinem Fall einen Schutz. Damit finden sämtliche Kreuzreaktionen, die bei mir im Antikörpernachweis mit Hilfe der Gegenstromelektrophorese positiv waren, keine Bestätigung. Auch TÜLLMANN (1976) konnte zwischen *B. rodhaini* und *B. musculi* ähnliche Ergebnisse vorweisen und führte dies trotz der serologischen Befunde auf eine artspezifische Immunität zurück; es kann aber auch der immunogene Schutz einer schwächer virulenten Babesienart nicht für eine Belastung mit einer stärker pathogenen Art, insbesondere für *B. rodhaini* genügen.

Eine wenig spezifische Immunität konnte ich in meinen Untersuchungen dadurch bekräftigen, daß somatische *B. rodhaini*-Antigene wie die somatischen Babesienantigene der restlichen 3 Babesienarten nur gegen diese 3 Arten eine Kreuzimmunität hervorriefen, was durch die verlängerte Präpatenzperiode, sowie die nicht so stark ausgeprägte Parasitämie belegt wird. MAHONEY (1967) und PHILLIPS (1967) führen die wenig spezifische Immunität auf einen Antigenstrukturwandel zurück. Einen geringeren Immunschutz des wäßrigen Totalextraktes von *B. rodhaini*-Antigen gegen die *B. rodhaini*-Belastungsinfektion bekräftigen auch SCHINDLER, WOKATSCH und SCHRÖDER (1966) bei ihrem Versuch, Hunde mit Extraktantigenen von *B. canis* zu immunisieren. Sie konnten zwar hohe Antikörpertiter, jedoch keinen Immunschutz feststellen. Umso überraschender war deshalb, daß ein Teil der Mäuse, die mit wäßrigem Totalextrakt von *B. microti* bzw. *B. galagolata* immunisiert worden waren, nach *B. rodhaini*-Infektion die Parasitenvermehrung entscheidend unterdrückten und die Infektion überlebten. Diese Tatsache könnte durch Versuchsergebnisse von SIBINOVIC und M. (1969) erklärt werden, die bei Un-

tersuchungen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie feststellten, daß die Babesien während ihrer Entwicklung Antigene in das Erythrozytenplasma abgeben und diese sich dort anreichern. Ungeklärt bleibt allerdings, ob die Menge des Antigens von der hohen Zahl der Parasiten abhängt oder an bestimmte Entwicklungsstadien gebunden ist.

Auch MAHONEY und GOODGER (1972) gelangten bei Untersuchungen mit Immunglobulin zu der Ansicht, daß diese mehr gegen die veränderten Erythrozyten gerichtet sind; es wäre somit der Ursprung der Antigene verstärkt in den Erythrozyten zu suchen. COX und YOUNG (1969) erhielten bei heterologen Belastungsinfektionen von mit *B. rodhaini* immunisierten Tieren durch *B. microti*-Infektion, ähnlich meinen Ergebnissen, höhere Parasitämiewerte. Daraus schlossen sie auf stärker spezifische, aber auch teilweise unspezifische immunogene Wirkung. Ob diese unspezifische Wirkung vom Wirtsprotein, von den parasitierten Erythrozyten oder aber von den Babesien selbst verursacht wird, konnte auch MCHARDY (1967) an Hand von artfremden somatischen Antigenen nicht abklären. Entsprechend dem langsamen immunogenen Wirkungsverlust, bedingt durch die allmähliche Resorption der subkutan injizierten somatischen Antigenemulsion und die zunehmende Vermehrung der infizierten Parasiten, erreichen stets die weniger virulenten Babesienarten ihr Parasitämiemaximum erst in der 2. Hälfte des Beobachtungszeitraumes von 42 Tagen.

Bei Mäusen, die eine *B. rodhaini*-Infektion überlebten fand ich um den 12. Tag p.i., bei anderen Tieren, die jeweils mit einer der übrigen Babesienarten belastet wurden, ab dem 30. Tag p.i. vermehrt Retikulozyten im Blutausstrich. Durch das Absinken der Erythrozytenzahl, verursacht durch den starken oder längeren Parasitenbefall, kommt es zu einer Stimulierung des RES. Dadurch wird durch Vorstufen der Erythrozyten der lebensnotwendige Sauerstofftransport kompensiert und die schnelle

Eliminierung befallener roter Blutkörperchen bewirkt.

Bei gegen *B. rodhaini* immunisierten Mäusen entnahm ich nach dem Abfall der Parasitämie unter 10 % Blut zur Kontrolle der Infektiosität von *B. rodhaini*. Es war eine Virulenzschwächung eingetreten, was auch SCHINDLER und M. (1966) bei nicht steriler Immunität durch die lange Persistenz von *B. canis* in Hunden bemerkten. Es kam bei nicht immunisierten Tieren erst nach 15 - 17 Tagen zum Exitus und nicht schon nach 7 - 9 Tagen. Durch erneute Mäusepassagen konnte aber die ursprüngliche Virulenz wieder erreicht werden.

Weniger gute immunogene Wirkung zeigten die metabolischen Serumgesamtantigene. Sämtliche mit den 4 metabolischen Babesienantigenen immunisierten Mäuse zeigten zwar ähnliche Präpatenz, wie die mit somatischen Antigenen immunisierten Tiere. Die Parasitämie-maxima lagen auch beim homologen Challengeversuch mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* im Durchschnitt um 50 - 100 % höher, d.h. der Immunschutz gegen die 3 weniger virulenten Babesienarten war weniger stark ausgebildet. Für die Belastung mit *B. rodhaini* jedoch war die Immunität nicht ausreichend; die Parasitämie-Verlaufskurve glich den Kontrollen. TÜLLMANN (1976) stellte bei ihren Untersuchungen bei mit *B. rodhaini* und mit *B. musculi* immunisierten Mäusen bei Belastungsinfektion mit *B. rodhaini* ebenfalls keinen Immunschutz fest. Sie führt ihre negativen Ergebnisse auf eine zu geringe Menge antigenhaltigen Materials zurück, so daß zwar serogene Antikörper nachgewiesen werden konnten, eine protektive Wirkung im Sinne eines Immunschutzes jedoch nicht gegeben war.

Die geringe Prämmunität bei Belastung mit weniger virulenten Babesienarten deckt sich mit den Ergebnissen von MAHONEY und GOODGER (1972), die Immunisierungsversuche mit *B. argentina* bei Rindern durchführten. Sie führen den schwachen Schutz teilweise auf wirtseigene Serum-

komponenten zurück, die sie mit Hilfe spezifischer Antiseren nachwiesen. SIBINOVIC (1966) erzielte bei Hunden mit homologem Serumgesamtantigen anfänglich Immunschutz gegen *B. canis* für 9 Monate. Bei einem späteren Versuch mit heterologem Serumgesamtantigen jedoch stellten SIBINOVIC und M. (1967 a) bei Belastung mit *B. rodhaini* nur geringe Immunität fest. Nach Meinung von SIBINOVIC und M. (1969) kommt es zu einer Anreicherung von Stoffwechselprodukten im infizierten Erythrozyten und zu einer Diffusion dieser antigen wirkenden Substanz in das Serum, womit die in meinen Versuchen festgestellte schwächere Prämunität im Gegensatz zu den somatischen Antigenen erklärt werden könnte. Die fehlende Spezifität führt TULLMANN (1976) auf gemeinsame Antigenbestandteile von *B. rodhaini* und *B. musculi* zurück, die durch serologische Kreuzreaktionen belegt worden waren. Auch MAHONEY (1966) hat 2 gemeinsame Teilantigene zwischen *B. argentina* und *B. bigemina* nachgewiesen. RISTIC und M. (1971) stellten ähnliches bei den Hundebabesienarten *B. canis* und *B. gibsoni* fest. In der Immunodiffusion konnten sie neben speziesspezifischem auch ein gemeinsames gattungsspezifisches Antigen nachweisen. ZWISLER (1976) führt die zwischen verschiedenen Arten auftretenden Kreuzreaktionen auf immunologische Reaktionen zurück, die unterschiedliche Entwicklungsformen induzieren. ROBERTS und TRACEY-PATTE (1975 a) gelang dieser Nachweis von Antigenvarianten an mit *B. rodhaini* infizierten Mäusen. Durch Immunseren hielten sie die Tiere am Leben und konnten je nach Konzentration und Spezifität der Antikörper ständige Antigenabänderung beobachten.

Um die molekulare Zuordnung der serumlöslichen Antigene abzuklären, nahm ich eine Fraktionierung der antigenhaltigen Seren hochparasitärischer Mäuse an der Sephadex G-200 Säule vor. TULLMANN (1976) konnte serolo-

gisch nachweisen, daß 1 - 3 von insgesamt 6 Fraktionen im Globulinbereich lagen.

An Hand der Parasitämie-Verlaufskurven war die Fraktion 1 meiner Auftrennungen von besonderem Interesse. Hatte schon TÜLLMANN (1976) serologisch strenge Art-spezifität der Fraktionen festgestellt und damit auf eine reinere Darstellung der Antigene geschlossen, so konnte ich durch Immunisierung mit serumlöslichem B. rodhaini-Antigen der Fraktion 1 nach erneuter Belastung mit B. rodhaini 75 % der Tiere am Leben erhalten. Die Parasitämie-Verlaufskurve dieser Mäuse gleicht der Parasitämiekurve von mit somatischem B. rodhaini-Gesamtantigen immunisierten Tieren, die ebenfalls mit B. rodhaini belastet wurden. Mäuse, die mit der Fraktion 1 der weniger virulenten Babesienarten immunisiert worden waren und mit B. rodhaini belastet wurden, zeigten gering verzögerten oder normalen Parasitämieverlauf, der stets mit dem Exitus der Tiere endete. Obwohl hiermit eine Speziespezifität des Immun-schutzes durch die Fraktion 1 angedeutet wird, kann sie nicht schlüssig bewiesen werden.

MAHONEY und GOODGER (1972) berichten von der Spezifität serumlöslicher Antigene im Globulinbereich. Sie untersuchten an mit B. argentina infizierten Rindern die immunisierende Wirkung von Immunglobulinen, die stets streng spezifisch mit dem Serumantigen reagierten. Bei Belastung von Mäusen, die mit der Fraktion 1 von B. rodhaini immunisiert worden waren und mit B. musculi, B. microti und B. galagolata belastet wurden, traten eine verlängerte Präpatenz sowie zwei etwa gleich hohe Parasitämiemaxima, um den 17. und 29. Tag p.i. auf. Die Peaks entsprachen etwa der halben Höhe der maximalen Parasitämie der Kontrolltiere. Daraus läßt sich ablesen, daß die Fraktion 1 auch gattungsspezifische Prämunität bewirkt.

SIBINOVIC und M. (1967 a/b) erhielten serologisch im Gegensatz zu TÜLLMANN (1976) ebenfalls nach säulen-chromatographischer Auftrennung Kreuzreaktionen zwischen den Babesienarten *B. canis*, *B. rodhaini* und einem Gemisch aus *B. equi* und *B. caballi*. COX und YOUNG (1968 a) bestätigten SIBINOVIC und M. (1967 a/b) und führen die Kreuzreaktionen auf ähnliche Struktur der an Globulin gebundenen Antigene zurück. Die Prämunizität der Fraktion 1 schützte in meinen Versuchen die Mäuse für ca. 25 Tage und führte dann zu einer abgeschwächten Parasitämie. Auch die mit *B. musculi* immunisierten Tiere zeigten einen ähnlichen Parasitämieverlauf nach Infektion mit den drei weniger virulenten Babesienarten. Die Parasitämie-Verlaufskurve von mit *B. microti* bzw. *B. galagolata* immunisierten Mäusen der Fraktion 1 zeigten einen nur geringen immunogenen Schutz sowohl gegen homologe wie heterologe Belastung; dies führte ich auf eine geringere Virulenz und damit auf schwächere immunogene Eigenschaften zurück.

Waren die Parasitämie-Verlaufskurven der Fraktionen 2 - 6 von mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* immunisierten Tiere nach Belastung mit allen 4 Babesienarten sehr ähnlich den Kontrollen, so zeigten die Mäuse mit den Fraktionen 2 - 6, die mit *B. rodhaini* immunisiert worden waren, nach Belastung mit den drei weniger virulenten Babesienarten einen ungewöhnlichen Parasitämieverlauf. Die Parasitämie stieg vor allem bei den mit *B. microti* und *B. galagolata* belasteten Mäusen auf Durchschnittswerte von 740 bzw. 460 ‰ an, die selbst bei den negativen Kontrollen nie erreicht wurden. Einige Tiere starben. Ich führe dies auf Autoantigene zurück, die durch Antigene der virulenten *B. rodhaini*-Art ausgelöst wurden. MCHARDY (1967) beobachtete ebenfalls nach Babesieninfektion mit *B. rodhaini* verstärkt Anämie und schreibt dies Autoimmunoantigenen zu. Auch RISTIC und M. (1971) glau-

ben, daß durch die nun verstärkte Erythropoesestimulation ein schützender Effekt hervorgerufen wird. Dies konnte ich durch den starken Rückgang der Parasitämie nach einer bzw. zwei Wochen belegen. MAHONEY und GOODGER (1972) gelang bei mit *B. argentina* infizierten Kälbern sogar ein makromolekulares, Lysin stimulierendes Autoantigen darzustellen, das auch bei chemisch induzierter Anämie nachgewiesen wurde.

Aus meinen Ergebnissen wird ersichtlich, daß die somatischen Antigene eine starke, aber weitgehend unspezifische Immunität gegen die 4 verwendeten *Babesien* entwickelten. Die serologisch nachgewiesene Artspezifität der Fraktion 1 von *B. rodhaini* und *B. musculi* konnte mit meinen Immunisierungs-Untersuchungen nicht bestätigt werden.

V. Zusammenfassung

Es wurden somatische und metabolische Antigene von *Babesia rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* auf ihre immunisierenden Eigenschaften an Mäusen untersucht.

Alle somatischen Antigene der 4 verwendeten Babesienarten entwickelten eine starke, nur gattungsspezifische Immunität gegen *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata*. Allerdings widerstanden nur die mit den 3 somatischen *B. rodhaini*-Antigenen sowie die mit den wäßrigen Totalextrakten von *B. microti* und *B. galagolata* immunisierten Mäuse der Belastungsinfektion mit der virulenten Art *B. rodhaini* und entwickelten eine Prämunität. Alle mit den übrigen Antigenen immunisierten Mäuse starben nach einer Infektion mit *B. rodhaini* nach einem protrahierten Krankheitsverlauf.

Einen geringeren immunisierenden Effekt zeigten die metabolischen Antigene. Der durch sie erzeugte Immunschutz ist ebenfalls gattungsspezifisch. Durch die säulenchromatographische Fraktionierung der serumlöslichen Antigene konnte eine stärkere immunisierende Wirkung erzielt werden.

Eine sterile Immunität, die nicht nur den Tod der Tiere, sondern auch das Angehen der Belastungsinfektion und damit die Ausbildung einer Prämunität verhinderte, konnte in keinem Falle erreicht werden.

Summary

Investigations into immunization of mice against Babesia rodhaini, B. musculi, B. microti and B. galagolata.

Somatic and metabolic antigens of *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* and *B. galagolata*, were tested for their immunizing properties in mice.

In animals immunized with somatic antigens of the four *Babesia* species on infection with *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* and *B. galagolata* led to a state of premunition. This premunition was genus-specific.

Only mice immunized with the three somatic antigens of *B. rodhaini* and the aqueous total extract of *B. microti* and *B. galagolata* survived the challenge infection with the virulent *B. rodhaini* and developed premunition.

Also the metabolic antigens showed a good immunizing effect. The immunity produced is also genus-specific. By columnchromatographic fractioning purer serum-soluble antigens could be obtained which had a stronger immunizing capacity.

It was shown that the immunity induced by somatic antigens was superior to that induced by metabolic antigens. In all cases the sterile immunity was only partial and allowed the challenge infection to develop into a premun.state.

Literaturverzeichnis

1. Callow, L.L. (1964): Strain immunity to babesiosis. Nature (London) 204, 1213 - 1214
2. Clark, J.A., E.J. Wills, J.E. Richmond, A.C. Allison (1975): Immunity to intra-erythrocytic protozoa. Lancet 6, 1128 - 1131
3. Cox, F.E.G., A.S. Young (1969): Acquired immunity to Babesia microti and Babesia rodhaini in mice. Parasitology 59, 257 - 268
4. Cox, F.E.G., S.A. Turner (1970): Antibody levels in mice infected with Babesia microti. Ann. Trop. Med. Parasit. 64, 767 - 773
5. Cox, F.E.G. (1972): Protective heterologous immunity between Plasmodium atheruri and other P.spp. and Babesia spp. in mice. Parasitology 65, 379 - 387
6. Cox, H.W., R. Milar, S. Patterson (1968 a): Serologic cross-reactions of serum antigens associated with acute Plasmodia and Babesia infections. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17, 13 - 19
7. Cox, H.W., R. Milar, S. Patterson (1968 b): Cross-protection immunization by Plasmodia and Babesia infections of rats and mice. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17, 173 - 179
8. D'Alesandro, P.A. (1972): Trypanosoma lewisi: Production of exoantigens during infection in the rat. Expl Parasit. 32, 149 - 164
9. Dennig, H.K. (1973): Babesia galagolata n.sp., eine Babesienart des Galagos (Galago crassicaudatus). Ztschr. Parasitkde 41, 281 - 290
10. Hall, W.T.K. (1960): Passive transfer of immunity to B. argentina from mother of offspring, presumably by antibody in colostrum. Aust.Vet.J. 36, 361 - 363

11. Hullinger, L., E. Sorkin (1963): Synthesis of antibodies by blood leucocytes of the rabbit.
Nature (London) 198, 299 - 302
12. Levine, N.D. (1973): Protozoon parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Comp., Minneapolis
13. Ludford, C.G., A.J. Sulzer, M. Wilson, W.T.K. Hall (1972): Babesia argentina, Plasmodium vivax, and Pl. falciparum: Antigenic cross-reactions.
Expl Parasit. 20, 317 - 326
14. Mahoney, D.F. (1966): Circulating antigens in cattle infected with B. bigemina or B. argentina.
Nature (London) 211, 422 - 429
15. Mahoney, D.F. (1967): Bovine babesiosis: The immunization of cattle with killed B. argentina.
Expl Parasit. 20, 125 - 129
16. Mahoney, D.F., B.V. Goodger (1972): Babesia argentina: Immunogenicity of plasma from infected animals.
Expl Parasit. 32, 71 - 85
17. McHardy, N. (1967): Immunization of rats against Babesia (Nutallia) rodhaini. Nature (London) 214, 805 - 807
18. McHardy, N. (1972): Protective effect of haemolytic serum on mice infected with Babesia rodhaini.
Ann. Trop. Med. Parasit. 66, 1 - 5
19. Phillips, R.S. (1967): Active immunization of rats against Babesia (Nutallia) rodhaini using a killed vaccine. Parasitology 57, 11 P.
20. Phillips, R.S. (1969): Babesia rodhaini infections in the rat after acute primary parasitaemia.
Parasitology 59, 349 - 356
21. Phillips, R.S. (1969 a): The protective activity of serum from immune rats against Babesia rodhaini.
Parasitology 59, 357 - 364

22. Phillips, R.S. (1969 b): The role of the spleen in relation to natural and acquired immunity to infections of *Babesia rodhaini* in the rat. *Parasitology* 59, 637 - 648
23. Phillips, R.S. (1971 a): Immunity of rats and mice following injection with ^{60}Co irradiated *Babesia rodhaini* infected red cells. *Parasitology* 62, 221 - 231
24. Phillips, R.S. (1971 b): Antigenic variation in *B. rodhaini* demonstrated by immunization with irradiated parasites. *Parasitology* 63, 315 - 322
25. Ristic, M., J.D. Lykins, A.R. Smith, D.L. Huxsoll, M.G. Groves (1971): *Babesia canis* and *Babesia gibsoni*: Soluble and corpuscular antigens isolated from blood of dogs. *Expl Parasit.* 30, 385 - 392
26. Roberts, J.A., P.D. Tracey-Patte (1975 a): *Babesia rodhaini*: Immuno-induction of antigenic variation. *Int. J. Parasit.* 5, 573 - 576
27. Roberts, J.A., P.D. Tracey-Patte (1975 b): *Babesia rodhaini*: A study of the effects of immune serum. *Int. J. Parasit.* 5, 577 - 581
28. Schindler, R., H.K. Dennig (1962): Versuche zum Nachweis von Antikörpern gegen Babesien mit der Komplementbindungsreaktion. *Ztschr. Tropenmed. Parasit.* 13, 480 - 488
29. Schindler, R., R. Wokatsch, G. Schröder (1966): Immunität und serologische Reaktion gegen *Babesia canis* bei Hunden nach Infektion mit lebenden Parasiten und nach Immunisierung mit einem löslichen Antigen. *Ztschr. Tropenmed. Parasit.* 17, 226 - 240
30. Schindler, R., G. Schröder, R. Stieger, S. Wirahadiredja, W. Kessler (1970): Weitere Untersuchungen über Immunität und serologische Re-

- aktionen beim Hund nach einer Infektion durch *Babesia canis*. Ztschr. Tropenmed. Parasit. 21, 182 - 190
31. Schröder, W.F., H.W. Cox, M. Ristic (1966 a): Anaemia, parasitaemia, erythrophagocytosis, and haemagglutinins in *Babesia rodhaini* infection. Ann. Trop. Med. Parasit. 60, 31 - 38
32. Schröder, W.F. (1966 b): Autoimmune processes associated with anaemia of infection with *Babesia rodhaini*, *Plasmodium berghei*, and *Anaplasma marginale*. Ph. D. Thesis, University of Illinois, Urbana, Illinois
33. Sibinovic, K.H. (1966): Immunologic properties of soluble antigens from blood of animals with acute babesiosis. Ph. D. Thesis, University of Illinois, Urbana, Illinois
34. Sibinovic, K.H., R. McLeod, M. Ristic, S. Sibinovic, H.W. Cox (1967 a): A Study of some of the physical, chemical and serological properties of antigens from sera of horses, dogs and rats with acute babesiosis. J. Parasit. 53, 919 - 923
35. Sibinovic, K.H., S. Sibinovic, M. Ristic, H.W. Cox (1967 b): Immunogenic properties of babesial serum antigens. J. Parasit. 53, 1121 - 1129
36. Sibinovic, K.H., S. Sibinovic, M. Ristic, H.W. Cox (1969): In vivo and in vitro effects of serum antigens of babesial infections, and their antibodies on parasitized and normal erythrocytes. Ann. Trop. Med. Parasit. 63, 327 - 336
37. Soltys, M.A. (1973): A review of studies on immunization against protozoon diseases of animals. Ztschr. Tropenmed. Parasit. 24, 309 - 322
38. Soulsby, E.J.L. (1972): Immunity to animal parasites. Academic Press, Inc., New York and London.

39. Tüllmann, K. (1976): Untersuchungen über antigene Eigenschaften von *Babesia rodhaini* und *Babesia musculi* in der Immunodiffusion, Gegenstrom-elektrophorese und Immunelektrophorese am Modell der Maus. Vet. Med. Diss., München 1976
40. Wright, J.G. (1975): The probable role of *Babesia argentina* esterase in the in vitro activation of plasma Prekallikrein. Vet. Parasit. 1, 91 - 96
41. Zwisler, O. (1976): Immunologische Reaktionen bei Parasitenbefall.
7. Tagung der Dt. Gesellschaft für Parasitologie, Berchtesgaden 1976

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boeh möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Hilfe, sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut danken.

Desgleichen gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. G. Weiland für die jederzeit gern gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich Fräulein B. Schmöger für die bereitwillige Hilfe in technischen Fragen.

Lebenslauf

Am 1. August 1947 wurde ich als ältester Sohn des Diplom-
agraringenieurs Ottmar Eger und seiner Ehefrau Anna, geb.
Götzfried, in Schwabmünchen geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Schwabmünchen trat ich
in das Dominikus-Zimmermann-Gymnasium in Landsberg am Lech
ein, wo ich 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Von August 1968 bis September 1969 leistete ich die land-
wirtschaftliche Praktikantenzeit ab mit anschließender
staatlicher landwirtschaftlicher Abschlußprüfung. Im Herbst
1969 begann ich das Studium der allgemeinen Agrarwissen-
schaften an der Universität Stuttgart-Hohenheim.

Nach Ablegen der landwirtschaftlichen Vorprüfung und Aner-
kennung als Vorphysikum der Studienrichtung Tiermedizin
wechselte ich zu Beginn des Wintersemesters 1970/71 an die
tierärztliche Fakultät der Universität München über, wo
ich im Sommer 1975 das Staatsexamen bestand. Meine Appro-
bation als Tierarzt erhielt ich am 30.10.1975.

